# UNTERSUCHUNGEN ZUR SAUERSTOFF-VERSORGUNG VON DIGITALIS LANATA-FERMENTERKULTUREN AUSWIRKUNGEN AUF WACHSTUM UND 12 ß-HYDROXYLIERUNG

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard - Karls - Universität zu Tübingen

vorgelegt von
HEINRICH SPIELER
aus Ravensburg

1984
~~1985~~

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536515_0011

# UNTERSUCHUNGEN ZUR SAUERSTOFF-VERSORGUNG VON DIGITALIS LANATA-FERMENTERKULTUREN AUSWIRKUNGEN AUF WACHSTUM UND 12 ß-HYDROXYLIERUNG

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard - Karls - Universität zu Tübingen

vorgelegt von
HEINRICH SPIELER
aus Ravensburg

1985

| | |
|---|---|
| Tag der mündlichen Prüfung: | 6. Dezember 1984 |
| Dekan: | Prof. Dr. K.-A. Kovar |
| 1. Berichterstatter: | Prof. Dr. E. Reinhard |
| 2. Berichterstatter: | Prof. Dr. H.P.T. Ammon |

Christine

und

meinen Eltern

gewidmet

Herrn Prof. Dr. E. Reinhard
danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und für seine freundliche Unterstützung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit.

Bei Herrn Dr. A.W. Alfermann und Herrn D. Schwantag möchte ich mich besonders für ihre ständige Hilfsbereitschaft und zahlreiche anregende Diskussionen bedanken.

Den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie danke ich sehr herzlich für die gute Zusammenarbeit.

Die vorliegende Arbeit wurde vom Bundesministerium für Forschung und Technologie gefördert.

Abkürzungen

| | |
|---|---|
| BR | Belüftungsrate |
| DC | Dünnschicht-Chromatographie |
| DO | Dissolved Oxygen = im Nährmedium gelöster Sauerstoff (Angaben in % der Sauerstoffsättigung) |
| GV | Glucose-Verbrauch |
| HPLC | Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie |
| LF | Leitfähigkeit |
| MDg | ß-Methyldigoxin |
| MDt | ß-Methyldigitoxin |
| Nl | Normalliter (Luft bei Normaldruck, 20°C) |
| PCV | Packed Cell Volume (Sedimentationsvolumen) |
| $t_d$ | Verdoppelungszeit |
| TG | Trockengewicht |
| upm | Umdrehungen pro Minute |
| vvm | Liter Luft pro Liter Nährlösung und Minute |
| $\mu$ | Spezifische Wachstumsrate |
| $\mu$S | Mikro-Siemens |

Inhaltsverzeichnis


| | | |
|---|---|---|
| A | Einleitung und Problemstellung | 1 |
| B | Material und Methoden | 8 |
| 1. | Chemikalien | 8 |
| 2. | Geräte und Zubehör | 9 |
| 3. | Pflanzenmaterial | 11 |
| 4. | Nährmedien | 12 |
| 4.1 | Grundmedium | 12 |
| 4.2 | LW-Medium | 13 |
| 4.3 | OCLW-Medium | 13 |
| 5. | Kulturbedingungen | 14 |
| 5.1 | Suspensionskulturen in Erlenmeyerkolben | 14 |
| 5.2 | Fermenterkulturen | 15 |
| 5.2.1 | Fermentationen mit Substratzugabe | 15 |
| 5.2.2 | Belüftung der Fermenter | 16 |
| 6. | Probenaufarbeitung | 17 |
| 6.1 | pH-Messung | 17 |
| 6.2 | Bestimmung des Sedimentationsvolumens | 17 |
| 6.3 | Glucose-Bestimmung | 17 |
| 6.4 | Leitfähigkeitsmessung | 17 |
| 6.5 | Trockengewichtsbestimmung | 17 |
| 7. | Analytik der Glykoside | 18 |
| 7.1 | Aufarbeitung der Proben | 18 |

| | | |
|---|---|---|
| 7.2 | HPLC-Programm zur direkten Messung von MDt und MDg aus dem Nährmedium | 19 |
| 8. | Berechnung der Spezifischen Wachstumsrate $\mu$ | 20 |
| 9. | Berechnung der $k_La$-Werte | 21 |
| C | Ergebnisse | 23 |
| 1. | Wachstumsversuche bei unterschiedlichem Gehalt an gelöstem Sauerstoff im Nährmedium | 23 |
| 1.1 | Fermentation mit DO = 10 % | 25 |
| 1.2 | Fermentation mit DO = 20 % | 25 |
| 1.3 | Fermentation mit DO = 30 % | 27 |
| 1.4 | Fermentation mit DO = 40 % | 29 |
| 1.5 | Spezifische Wachstumsraten und Verdoppelungszeiten | 31 |
| 1.6 | Diskussion | 32 |
| 2. | Vergleich des Wachstums bei verschiedenen Belüftungsarten | 34 |
| 2.1 | Fermentation mit dem Zellstamm R 287 T | 34 |
| 2.2 | Fermentation mit dem Zellstamm 287 | 36 |
| 2.3 | Diskussion | 39 |
| 3. | Wachstumsversuche in verschiedenen Fermentern | 41 |
| 3.1 | Fermentation mit dem Zellstamm 287 | 41 |
| 3.2 | Fermentation mit dem Zellstamm 287-DRB-A1/10 | 44 |
| 3.3 | Diskussion | 46 |
| 4. | Einfluß des gelösten Sauerstoffs auf die 12ß-Hydroxylierung von ß-Methyldigitoxin | 48 |
| 4.1 | Hydroxylierung bei DO = 30 % | 48 |
| 4.2 | Hydroxylierung bei DO = 5 % | 51 |

4.3 Absenken des DO während der Fermentation 54
4.4 Erhöhung des Sauerstoffgehalts im Nährmedium 61
4.4.1 Fermentation mit DO = 50 % 61
4.4.2 Erhöhen des DO während der Fermentation 63
4.4.3 Fermentation mit dem Zellstamm 10/56-S-50-Se 66
4.5 Diskussion 68
5. Hydroxylierungsvergleich bei verschiedenen Belüftungsarten 71
5.1 Ergebnis der Fermentationen 71
5.2 Diskussion 73
6. Hydroxylierungsvergleich mit verschiedenen Fermentern 75
6.1 Ergebnis und Diskussion der Fermentationen 75
7. Vergleich von verschiedenen Fermentern und Rührsystemen durch $k_La$-Messungen 79
7.1 $k_La$-Messungen bei Airlift-Fermentern 80
7.2 $k_La$-Messungen im Biostat U30D-Fermenter mit verschiedenen Rührsystemen 83
7.3 Diskussion 86
8. Fermentationen mit MLt-Zugabe im Biostat U30D-Fermenter mit Rührer-Betrieb 90
8.1 Fermentation mit dem Wendel-Rührer 91
8.2 Fermentation mit dem Spin-Rührer 93
8.3 Diskussion 95

9 Zusammenfassung der Ergebnisse 97

10 Literaturverzeichnis 100

## A Einleitung und Problemstellung

Die Gewinnung von Arzneistoffen aus pflanzlichen Zellkulturen ist auf verschiedene Weise möglich. Zum einen sind pflanzliche Zellkulturen in der Lage, Sekundärstoffwechselprodukte zu bilden und anzureichern, andererseits können sie auch Biotransformationen ausführen.
Ein wirtschaftlicher Einsatz pflanzlicher Zellkulturen ist jedoch nur in folgenden Fällen sinnvoll (BARZ und ELLIS 1981):

- die Inhaltsstoffe müssen in der Zellkultur in höherer Konzentration als in der Pflanze vorliegen, oder das Pflanzenmaterial ist nicht in ausreichender Menge zu erhalten
- Produktion wertvollerer Stoffe aus billigen Vorstufen, wenn eine Biotransformation mit Mikroorganismen oder eine chemische Umwandlung nicht möglich ist
- Produktion neuer Inhaltsstoffe, z.B. Biosynthese-Zwischenprodukte
- Produktion von pflanzenspezifischen Inhaltsstoffen (z.B. Enzymen), die nur aus der lebenden Zelle isoliert werden können.

Bei einigen pflanzlichen Zellkulturen ist es bereits gelungen, in der Zellkultur höhere Konzentrationen an Inhaltsstoffen zu erreichen als in der Pflanze selbst (FOWLER 1981, ALFERMANN 1983). Viele Zellkulturen aber produzieren die gewünschten Inhaltsstoffe nicht oder nicht in ausreichender Menge; hierfür wird der morphologische Zustand der Zellen verantwortlich gemacht. Durch den Verlust der morphologischen Differenzierung verlieren die Zellen die Fähigkeit, Sekundärstoffwechselprodukte in größeren Mengen zu bilden und anzureichern (REINHARD 1975). Zwar ist die genetische Information für die Bildung der Inhaltsstoffe in der Zelle vorhanden, die Ausnutzung dieser Information wird aber unterdrückt (TEUSCHER 1973).

Eine Möglichkeit, zu höher produzierenden Zellkulturen zu gelangen, beschreibt ZENK (1978). Die Methode besteht im wesentlichen in einer Selektion hochproduzierender Zellen aus einer Zellsuspension und anschließender Rückführung in eine Kallus-Kultur. Noch nicht vorauszusehen ist die Entwicklung der Gentechnologie auf diesem Gebiet. Hier ist in den nächsten Jahren mit weiteren Fortschritten auf dem Weg zu hochproduzierenden pflanzlichen Zellkulturen zu rechnen.

Zahlreich sind die Biotransformationen, die von pflanzlichen Zellkulturen ausgeführt werden können (REINHARD und ALFERMANN 1980). Dabei ist es auch möglich, daß von einer Zellkultur Stoffe umgewandelt werden, die gar nicht zu ihrem Inhaltsstoff-Muster gehören. Auf diese Weise kann man

auch zu neuen Substanzen gelangen, die bisher noch nicht bei Pflanzen gefunden wurden.

Auch Digitalis-Zellkulturen können Biotransformationen ausführen (REINHARD 1974, FURUJA et al. 1970). Von den zahlreichen möglichen Reaktionen je nach eingesetztem Substrat und Zellstamm (BOY 1975) ist die Umwandlung von ß-Methyldigitoxin zu ß-Methyldigoxin die wirtschaftlich bedeutendste (Abb. 1). Die hierzu erforderliche 12ß-Hydroxylierung wird von ausgewählten Digitalis lanata-Zellkulturen in hoher Ausbeute durchgeführt (REINHARD et al. 1975). Von wirtschaftlichem Interesse ist diese Umwandlung deshalb, weil bei der industriellen Gewinnung von Digoxin aus Digitalis lanata-Pflanzen Digitoxin als Nebenprodukt in großer Menge anfällt. Eine chemische Umwandlung des Digitoxins in das therapeutisch häufiger verwendete Digoxin ist bisher nicht möglich, lediglich die Methylierung der endständigen Digitoxose ist auf diesem Weg machbar. Man gelangt so zum ß-Methyldigitoxin, das sich für die Biotransformation besser eignet, da weniger Nebenprodukte anfallen als bei der Umwandlung von Digitoxin (REINHARD et al. 1975).

Mehrere Arbeiten haben sich bisher mit der Verbesserung der Biotransformation von ß-Methyldigitoxin zu ß-Methyldigoxin befaßt. WAHL (1977) entwickelte einen 20 l-Airlift-Fermenter, in dem die gleichen Ergebnisse wie in Erlenmeyerkolben erzielt wurden - ein erster Schritt zu einem erfolgreichen Scale-up. Weitere Untersuchungen zur Fermentation wurden

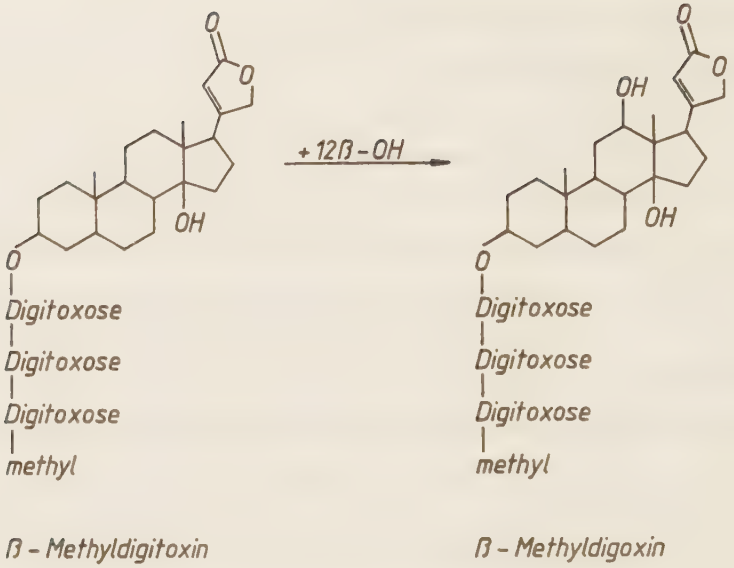



Abb. 1: Hydroxylierung von MDt zu MDg

von HELMBOLD (1979) durchgeführt, Verbesserungen des Nährmediums von BARTHLEN (1983) beschrieben. Auch ist es inzwischen gelungen, die Biotransformation in einem Fermenter mit 200 l Arbeitsvolumen erfolgreich durchzuführen (ALFERMANN et al. 1983), und HU (1984) untersuchte Möglichkeiten, höherproduzierende Zellstämme zu erhalten. Ein weiteres Problem war es bisher, die Biotransformationsfähigkeit eines Zellstammes längere Zeit zu erhalten. SEITZ et al. (1983) gelang es, Digitalis lanata-Zellen einzufrieren und in flüssigem Stickstoff zu lagern. Nach dem Auftauen hatten die Zellen die gleiche Biotransformationsfähigkeit wie die nicht-eingefrorene Kontroll-Kultur, sowohl in 300 ml-Suspensionskulturen als auch im 20 l-Airlift-Fermenter.

Ein Ziel dieser Arbeit ist es, die Einflüsse der Sauerstoff-Versorgung auf die Fermenterkulturen von Digitalis lanata-Zellen zu untersuchen. Ermöglicht wurde dies durch die Ausrüstung der Fermentationsanlagen mit Sauerstoff-Elektroden sowie den dazugehörenden Meß- und Regelgeräten. Bisher war es lediglich möglich, bei den Fermentationen die Belüftungsrate zu verändern und die Auswirkungen auf Wachstum und Biotransformation zu beobachten, es wurden aber keine Informationen über den Sauerstoffgehalt des Nährmediums erhalten. Da zahlreiche Zellkulturen bei Wachstum und Sekundärstoffwechsel eine Abhängigkeit von der Belüftung zeigen (MARTIN 1980), sollte dies auch für Digitalis lanata-Zellen näher untersucht werden, um sowohl für das Wachstum als auch für die Hydroxylierung von MDt zu MDg optimale Bedingungen zu schaffen.

Die Entwicklung der Sauerstoff-Elektroden ist inzwischen so weit fortgeschritten, daß sie routinemäßig bei Fermentationen eingesetzt werden können. Einen Überblick über die Entwicklung der Sauerstoff-Elektrode geben LEE und TSAO (1979). CLARK leistete 1956 einen entscheidenden Beitrag durch die Entwicklung einer polarographischen Elektrode, bei der eine gasdurchlässige Membran die Elektrode von der zu messenden Flüssigkeit trennt. Dadurch war der Einsatz in verschiedenen Flüssigkeiten möglich. Autoklavierbare und weiter verbesserte Versionen folgten, und die Sauerstoff-Elektroden konnten nun bei Fermentationen eingesetzt werden.

Die meisten der heute verwendeten Sauerstoff-Elektroden arbeiten nach dem CLARK-Prinzip: durch eine geeignete Polarisationsspannung wird Sauerstoff selektiv an der Kathode reduziert. Es resultiert ein elektrischer Strom, der dem Sauerstoffgehalt proportional ist.
Die Eichung des Anzeige-Instruments kann auf verschiedene Weise erfolgen, für Fermentationen in belüfteten Fermentern hat sich die Eichung in Prozent der Sauerstoffsättigung als geeignet erwiesen. Ein mit Luft gesättigtes Nährmedium wird als 100 % gesättigt definiert, sauerstoff-freies Nährmedium entspricht 0 % Sauerstoffsättigung. Bei den Meßgeräten besteht nun durch einen Regelkreis die Möglichkeit, den Sauerstoffgehalt des Nährmediums durch Veränderung der Belüftungsrate während der gesamten Fermentationsdauer konstant zu halten. Diese Möglichkeit soll zur Untersuchung der Auswirkungen unterschiedlicher Sauerstoffgehalte auf Wachstum und Biotransformation ausgenutzt werden.
Ebenso soll festgestellt werden, ob diese Art der Belüftung vorteilhafter ist als die früher übliche Methode mit konstanter Belüftungsrate während der gesamten Fermentationsdauer.

Beim Scale-up von Fermentationsprozessen muß neben anderen Fermentationsbedingungen auch eine entsprechende Belüftung und damit Sauerstoff-Versorgung aufrechterhalten werden. Eine weitere Aufgabe ist es daher, die vorhandenen Fermenter und ihre unterschiedlichen Belüftungs- und Rührsysteme unter diesem Gesichtspunkt zu vergleichen.

Weiterhin soll der Frage nachgegangen werden, ob die Hydroxylierung von MDt zu MDg durch Digitalis lanata-Zellkulturen nur im Airlift-Fermenter in befriedigender Weise möglich ist, oder ob hierfür ebenso Fermenter mit Rührer-Betrieb eingesetzt werden können. Bisher wurden die Biotransformationen nur in Airlift-Fermentern mit Erfolg durchgeführt. Mit dem Biostat U30D steht ein Fermenter zur Verfügung, in dem unterschiedliche Rührsysteme auf ihre Eignung für pflanzliche Zellkulturen getestet werden können.

## B Material und Methoden

### 1. Chemikalien

| | |
|---|---|
| Caseinhydrolysat | Difco Laboratories, Detroit, Michigan/USA |
| Glucose (Monohydrat) | Maizena Diät, Heilbronn |
| Glucoseoxidase | Beckman, München |
| ß-Methyldigitoxin | Boehringer, Mannheim |
| ß-Methyldigoxin | " " |
| Sauerstoff (technisch) | Messer Griesheim Industriegase, Düsseldorf |
| Stickstoff (reinst) | " " |

Alle anderen, hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden in analysenreiner Form von der Firma E.Merck, Darmstadt bezogen.

## 2. Geräte und Zubehör

| | |
|---|---|
| Schüttelschränke Typ KF 4 | Infors AG, Basel/Schweiz |
| Glucose-Analysator | Beckman, München |
| Luftsterilfilter 0,45 und 0,2 µm | Pall Filtrationstechnik, Dreieich |
| pH-Elektroden Typ 465 | Dr. W.Ingold, Frankfurt |
| $pO_2$-Elektroden | " " |
| pH/$pO_2$-Meß- und Registriergerät | Braun, Melsungen |
| Membranpumpen Fe 211 | " " |
| Thermostatierbares Wasserbad | Meßgerätewerk Lauda, Lauda-Königshofen |
| Kleinströmungsmeßgeräte | Krohne Meßtechnik, Duisburg |
| Gefriertrocknungsanlage Delta 1A | Christ, Osterode |
| Laminar flow-Räume | CEAG, Dortmund |
| Autoklav | Fedegari, Pavia/Italien |
| Leitfähigkeitsmeßgerät | Corning, Halstead/England |
| pH-Meter | WTW, Weilheim |
| Hochdruckflüssigkeitschromatograph 1084 B + LC-Terminal 79850 B | Hewlett Packard, Frankfurt |
| HPLC-Säulen | Dr. H.Knauer, Bad Homburg |
| Membranfilter 0,2 µm | Schleicher & Schuell, Dassel<br>Sartorius, Göttingen<br>Seitz, Bad Kreuznach |
| Servogor-Kompensationsschreiber RE 511 | Metrawatt, Nürnberg |

Fermenter:

1 20 l-Airlift-Fermenter Eigenbau (WAHL 1977)

2 Biostat U30D Braun, Melsungen

3 250 l-Airlift-Fermenter Chemap, Männedorf/Schweiz

4 300 l-Fermenter " "

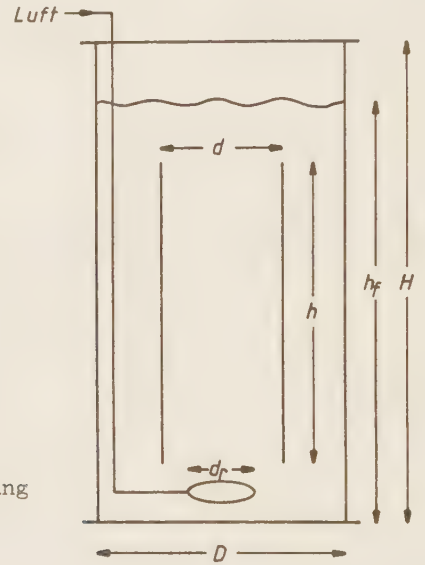
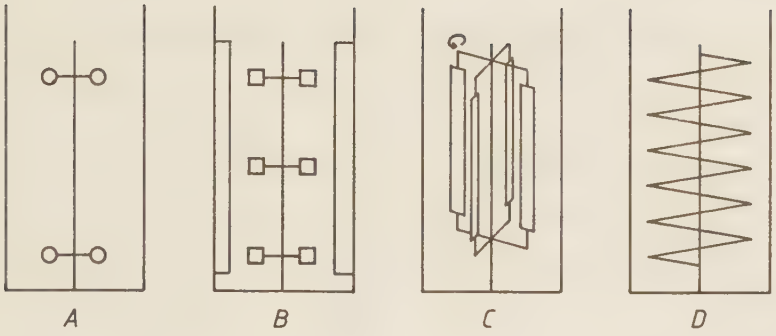



Abb. 2:
Schematische Darstellung der Fermenter

Tabelle 1: Abmessungen der Fermenter

| | D | H | d | h | $h_f$ | $d_r$ | Arbeits-volumen |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | cm | cm | cm | cm | cm | cm | l |
| 1 | 22,0 | 65,0 | 9,6 | 40,0 | 55,0 | 8 | 20 |
| 2 | 25,9 | 77,5 | 16,7 | 45,4 | 54,0 | 14 | 27 |
| 2* | 25,9 | 77,5 | - | - | 54,0 | 13 | 27 |
| 3 | 39,2 | 213,0 | 27,5 | 140,0 | 170,0 | 15** | 170 |
| 4 | 51,3 | 149,5 | 36,0 | 80,0 | 105,0 | 42 | 200 |

* bei Betrieb mit Rührer ** Siebplatte




A Propeller-Rührer (2 Rührsterne)

B Blatt-Rührer (3 Rührsterne + Schikanenkorb)

C Spin-Rührer (Chemap AG, Männedorf/Schweiz)

D Wendel-Rührer (Nattermann, Köln)

Abb. 3: Schematische Darstellung der im Biostat U30D verwendeten Rührer

## 3. Pflanzenmaterial

Zu den Versuchen wurden Suspensionskulturen folgender Zellstämme von Digitalis lanata Ehrh., Familie der Scrophulariaceae, verwendet:

R 287 T

287

sowie die durch Selektion verbesserten Zellstämme

287-DRB-A1/10 (SCHWANTAG 1983, Tübingen, unveröffentl.)

10/56-S-50-Se (HU 1984)

## 4. Nährmedien

Grundlage: modifiziertes MURASHIGE und SKOOG-Medium
(MURASHIGE und SKOOG 1962)

### 4.1 Grundmedium (G-Medium)

| Makroelemente | mg/l | mmol/l |
|---|---|---|
| $NH_4NO_3$ | 1650 | 20,6 |
| $KNO_3$ | 1900 | 18,8 |
| $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$ | 440 | 3,0 |
| $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ | 370 | 1,5 |
| $KH_2PO_4$ | 170 | 1,25 |

| Mikroelemente | mg/l | µmol/l |
|---|---|---|
| $Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$ | 37,2 | 100 |
| $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ | 27,8 | 100 |
| $H_3BO_3$ | 6,2 | 100 |
| $MnSO_4 \cdot 1\ H_2O$ | 16,9 | 100 |
| $ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$ | 8,6 | 30 |
| KJ | 0,83 | 5 |
| $Na_2MoO_4 \cdot 1\ H_2O$ | 0,25 | 1 |
| $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ | 0,025 | 0,1 |
| $CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$ | 0,025 | 0,1 |

| Organische Substanzen | mg/l |
|---|---|
| Thiaminiumdichlorid | 0,1 |
| Nicotinsäure | 0,5 |
| Pyridoxolhydrochlorid | 0,5 |
| Glycin | 2,0 |
| myo-Inosit | 100,0 |
| Caseinhydrolysat vitaminfrei | 1000,0 |
| Indolylessigsäure (Auxin) | 1,0 |
| 6-Furfurylaminopurin (Kinetin) | 2,0 |

angesetzt mit bidestilliertem Wasser,
pH eingestellt auf 5,5

4.2 LW-Medium

Anstelle von bidestilliertem Wasser mit Leitungswasser angesetzt. Leitfähigkeit des Leitungswassers bei 24°C: 300 uS/cm.

Versuche von BARTHLEN (1983) und SCHWANTAG (1983, Tübingen, unveröffentlicht) hatten gezeigt, daß für das Ansetzen der Nährmedien Leitungswasser verwendet werden kann, ohne daß bei der Zellkultur ein Verlust an Biotransformationsfähigkeit auftritt.

Veränderungen gegenüber dem Grundmedium:

$KH_2PO_4$ : 340 mg/l (doppelte Konzentration)

$MnSO_4 \cdot 1\ H_2O$ : 18,4 mg/l

$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$ : 10,6 mg/l

Glycin : 4,25 mg/l

4.3 OCLW-Medium

Wie LW-Medium, aber ohne Caseinhydrolysat

Verwendung der Nährmedien

- Suspensionskulturen in Erlenmeyerkolben:

| Zellstamm | Medium | Glucose-Gehalt |
|---|---|---|
| R 287 T | G | 2 % |
| 287 | G | 2 % |
| 287-DRB-A1/10 | OCLW | 3 % |
| 10/56-S-50-Se | LW | 3 % |

- Fermentation:

| Zellstamm | Medium | Glucose-Gehalt |
|---|---|---|
| R 287 T | G mit 3-facher Phosphat-Konz. | 1 % |
| 287 | G " " " " | 2 % |
| 287-DRB-A1/10 | OCLW | 2 % |
| 10/56-S-50-Se | LW | 2 % |

Sterilisation

Die Nährmedien im Erlenmeyerkolben und 20 l-Airlift-Fermenter wurden im Autoklaven, die Nährmedien im Biostat U30D-Fermenter über den dampfbeheizten Doppelmantel des Fermenters jeweils 20 min bei 121°C sterilisiert.
Glasgeräte und Fermenterzubehör wurden ebenfalls im Autoklaven 20 min bei 121°C sterilisiert.

Aufbewahrung der Nährmedien

Nach dem Autoklavieren wurden alle Nährmedien in einem dunklen Raum abgekühlt und aufbewahrt.

## 5. Kulturbedingungen

### 5.1 Suspensionskulturen in Erlenmeyerkolben

Zur Stammerhaltung und Vorzucht für Fermentationen wurde das Zellmaterial im Dauerdunkel in Schüttelschränken bei einer Frequenz von 120 upm und einer Temperatur von 24°C kultiviert.
Die Inoculummenge bestand aus 20 g Frischgewicht (bzw. 25 g

Frischgewicht bei Zellstamm 287), die in einen 1000 ml Erlenmeyerkolben mit 300 ml Nährlösung gegeben wurde. Das Umimpfintervall lag bei einer Woche (= 1 Passage).

5.2 Fermenterkulturen

Die Fermentationsversuche wurden in allen Fermentern im Dunkeln bei einer Temperatur von 24°C durchgeführt. Der Volumenverlust, der durch Probenahme und Belüftung entstand, wurde mit Wasser wieder auf das jeweilige Arbeitsvolumen ergänzt.

Da bei den Fermentationen meist eine stärkere Schaumbildung auftrat, ein Überschäumen des Fermenters aber vermieden werden sollte, wurde bei Bedarf ein Antischaummittel zugesetzt. Es bestand aus einer Suspension von 1,5 g Polypropylenglykol 2025 in 600 ml Wasser.

Bei Absinken des Glucose-Spiegels unter 5 g/l wurde mit Hilfe einer Membranpumpe eine 40 prozentige Glucose-Lösung zugegeben, so daß für die weitere Fermentationsdauer ein Glucose-Spiegel von ca. 5 g/l erhalten blieb.

5.2.1 Fermentationen mit Substratzugabe

Vorversuche in 1 l-Erlenmeyerkolben hatten gezeigt, daß es nicht notwendig war, die methanolische MDt-Lösung einer Sterilfiltration zu unterziehen. Lediglich das Vorratsgefäß für die MDt-Lösung und die Zuleitungen zum Fermenter wurden vorher sterilisiert und anschließend die methanolische MDt-Lösung unter sterilen Bedingungen in das Vorratsgefäß eingefüllt. Die Substratzugabe in den Fermenter erfolgte über

eine Membranpumpe, welche über eine Zeitschaltuhr so gesteuert wurde, daß eine gleichmäßige Versorgung mit MDt über 24 Stunden hinweg gewährleistet war. Die Konzentration der MDt-Lösung betrug zwischen 15 und 20 g/l.

5.2.2 Belüftung der Fermenter

- bei Fermentationen mit konstanter Belüftungsrate:
0,3 vvm während der gesamten Fermentationsdauer

- bei Fermentationen mit konstantem Sauerstoffgehalt im Nährmedium:
Der Sauerstoffgehalt im Nährmedium (DO) wurde mit Hilfe einer polarographischen Sauerstoff-Elektrode bestimmt. Bei Abweichungen vom vorgewählten Sollwert wurde ein Steuerventil betätigt, das nach Bedarf die Luftzufuhr erhöhte oder verringerte, bis der Sollwert wieder erreicht war.
Da bei den Airlift-Fermentern auch die Umwälzung der Suspensionkultur von der Luftzufuhr abhängig war, durfte hier die Luftzufuhr durch das Steuerventil nicht vollständig abgestellt werden. Die Steuerventile wurden daher so eingestellt, daß eine Grundbelüftung von ca. 0,1 vvm gewährleistet war.

## 6. Probenaufarbeitung

Das dem Fermenter je Probe entnommene Volumen betrug ca. 200 ml.

### 6.1 pH-Messung

Der pH wurde extern mit einer Glaselektrode bestimmt.

### 6.2 Bestimmung des Sedimentationsvolumens (PCV)

Von der gut gemischten Probe wurden 100 ml in einen Meßzylinder gegeben, und nach 20 min Absetzzeit wurde das Volumen der Zellmasse abgelesen.
Die Angabe des PCV erfolgte in %.

### 6.3 Glucose-Bestimmung

Der Glucose-Gehalt des zellfreien Mediums wurde mit einem Glucose-Analysator nach der GOD-Methode gemessen. Dazu wurde die Meßlösung so verdünnt, daß im linearen Meßbereich (50-500 mg Glucose/100 ml) gemessen werden konnte.

### 6.4 Leitfähigkeitsmessung

Mit einer Leitfähigkeits-Elektrode wurde bei 24°C im zellfreien Medium direkt die Leitfähigkeit in µS/cm bestimmt.

### 6.5 Trockengewichtsbestimmung (TG)

Das Gewebe aus der Sedimentationsvolumen-Bestimmung wurde abfiltiert, gefriergetrocknet und anschließend gewogen.

## 7. Analytik der Glykoside

Da sich sowohl das zugesetzte Substrat (MDt) als auch das Biotransformationsprodukt (MDg) zum weitaus größten Teil im Nährmedium befinden (HELMBOLD 1979), wurde die Konzentration der beiden Glykoside direkt aus dem abfiltrierten Nährmedium mittels HPLC bestimmt. Die HPLC-Methode erlaubte eine schnelle und gegenüber der fluorimetrischen DC-Auswertung auch genauere Messung der Glykoside (BARTHLEN 1983).

### 7.1 Aufarbeitung der Proben

5 ml Filtrat des Nährmediums wurden mit 10 ml Methanol versetzt und zum Schutz der Trennsäule durch ein Membranfilter mit 0,2 µm Porengröße in ein Probefläschchen filtriert, um die Lösung von Schwebstoffen zu befreien.

## 7.2 HPLC-Programm zur direkten Messung von MDt und MDg aus dem Nährmedium

| | |
|---|---|
| Stationäre Phase | : Merck LiChrosorb RP 8, 7 µm bzw. Macherey & Nagel Nucleosil 5C8 |
| Säulen | : Vorsäule 40 x 4,6<br>Hauptsäule 250 x 4,6 |
| Mobile Phase | : Acetonitril/Wasser 40:60<br>Gradientenprogramm von 40 % auf 50 % Acetonitril bis min 4, danach isokratisch bis min 10. |
| Temperaturen | : Acetonitril 30°C<br>Wasser 50°C<br>Ofen 40°C |
| Flußrate | : 2,0 ml/min |
| Säulendruck | : 100 bis 200 bar |
| Meßwellenlänge | : 220 nm |
| Referenzwellenlänge | : 350 nm |
| Papiergeschwindigk. | : 0,5 cm/min |
| Signalabschwächung | : $2^6$ |
| Einspritzmenge | : 40 µl |
| Analysenzeit | : 10 min |

## 8. Berechnung der Spezifischen Wachstumsrate $\mu$

Pflanzliche Zellkulturen in geschlossenen Systemen durchlaufen wie Mikroorganismen nach der Anlaufphase (lag-Phase) eine Phase exponentiellen Wachstums (log-Phase). Da in dieser log-Phase die stärkste Vermehrung an Zellmasse stattfindet, wird sie zur Charakterisierung des Wachstums herangezogen. In dieser Zeit hat auch die Spezifische Wachstumsrate $\mu$ einen konstanten Wert, und die graphische Darstellung des Wachstums (hier gemessen als Trockengewicht TG) in Abhängigkeit von der Zeit t auf halblogarithmischem Papier ergibt eine Gerade, deren Steigung der Spezifischen Wachstumsrate $\mu$ entspricht:

$$\mu = \frac{1}{t_2 - t_1} \cdot \ln \frac{x_2}{x_1}$$

wobei $x_1$ = TG zur Zeit $t_1$

und $x_2$ = TG zur Zeit $t_2$

Zwischen der Spezifischen Wachstumsrate $\mu$ und der Verdoppelungszeit $t_d$ besteht folgender Zusammenhang (KING 1980):

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Die Verdoppelungszeit $t_d$ gibt an, in welcher Zeit die Zellmasse den doppelten Wert erreicht hat.

## 9. Berechnung der $k_La$-Werte (Sauerstoffübergangskoeffizient)

Die Durchführung der Messung und Berechnung der $k_La$-Werte erfolgte nach der von RICHARDS (1961) beschriebenen polarographischen Methode. Die Zunahme der Sauerstoffkonzentration im Nährmedium eines Fermenters läßt sich durch folgende Gleichung ausdrücken:

$$\frac{dC}{dt} = k_La\ (C_s - C)$$

wobei $C_s$ der Sauerstoffsättigung (DO = 100 %) und C der Sauerstoffkonzentration im Nährmedium zu einer beliebigen Zeit t entspricht.

Durch Integration erhält man:

$$k_La = \frac{1}{t_2 - t_1} \cdot \ln \frac{C_s - C_1}{C_s - C_2}$$

Die graphische Darstellung von $\ln(C_s-C)$ in Abhängigkeit von der Zeit t ergibt eine Gerade, deren Steigung dem $k_La$-Wert entspricht.

### Durchführung der Messungen

Da es vor allem auf einen Vergleich der Fermenter und Rührer untereinander ankam, wurden die Messungen aus Kostengründen mit Leitungswasser anstatt Nährmedium ausgeführt.

Die Fermenter wurden bis zum Erreichen des Arbeitsvolumens mit Leitungswasser gefüllt und die Temperatur auf 24°C gehalten. Das Wasser wurde durch Begasen von gelöstem

Sauerstoff befreit und anschließend mit einer konstanten Belüftungsrate belüftet bzw. zusätzlich mit konstanter Drehzahl gerührt. Mehrfach ist in der Literatur eine Entgasung mit Natriumsulfit beschrieben (KATO et al. 1975; TANAKA 1981), diese Methode konnte bei den hier verwendeten Sauerstoff-Elektroden jedoch nicht angewandt werden, da hierdurch die Elektroden-Membran angegriffen wird (DR.W.INGOLD AG 1979).

Die Zunahme des gelösten Sauerstoffs (DO) wurde mit einer polarographischen Sauerstoff-Elektrode gemessen und von einem Schreiber aufgezeichnet. Die Meßwerte wurden auf halblogarithmisches Papier übertragen, und anschließend wurden aus dem linearen Bereich die Werte zur Berechnung entnommen.

## C Ergebnisse

### 1. Wachstumsversuche bei unterschiedlichem Gehalt an gelöstem Sauerstoff im Nährmedium

Die Versuche hatten zum Ziel, eine optimale Belüftung der Fermenterkulturen im Hinblick auf das Wachstum herauszufinden. Dazu wurden Fermentationen mit einem Gehalt an gelöstem Sauerstoff (DO) zwischen 10 und 40 % im 20 l-Airlift-Fermenter durchgeführt.

Bei allen Versuchen wurde der Zellstamm R 287 T verwendet, als Nährmedium diente das Grundmedium. Der Phosphat-Anteil wurde jedoch verdreifacht, da bei einfachem Phosphat-Anteil schon nach wenigen Tagen das Phosphat vollständig verbraucht war, andererseits das Wachstum im Fermenter bei erhöhtem Phosphat-Gehalt aber auch verbessert war (BARTHLEN 1983). Das Inoculum bestand bei allen Versuchen aus 12 Erlenmeyerkolben mit je 300 ml Zellsuspension einer 7 Tage alten Vorkultur.

Wegen unterschiedlich langer Fermentationszeiten wurden in den Tabellen 2 bis 5 die Angaben für Trockengewicht, Sedimentationsvolumen und Belüftungsrate zum besseren Vergleich der Werte jeweils nach 13 Tagen und bei Fermentationsende angegeben.

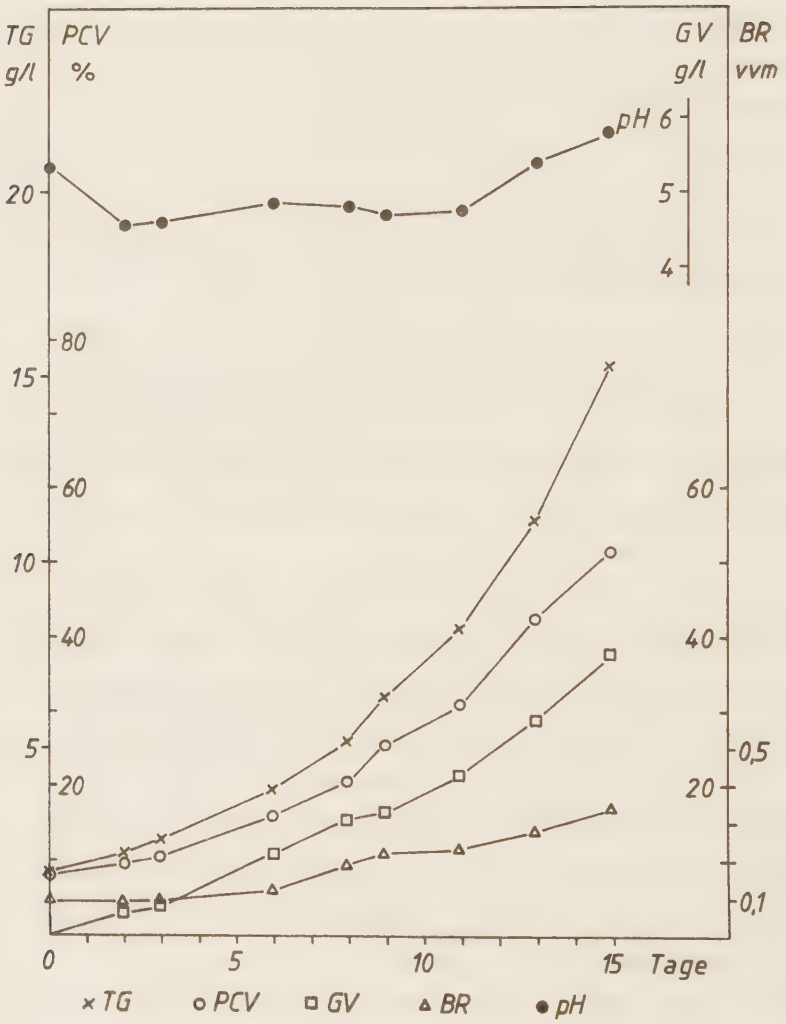



Abb. 4: Fermentation mit Zellstamm R 287 T;
Wachstumsverlauf bei DO = 10 %,
20 l-Airlift-Fermenter

1.1 Fermentation mit DO = 10 %

Der Verlauf der Fermentation ist in Abb. 4 dargestellt. Die Grundbelüftung des Airlift-Fermenters betrug 0,09 vvm. Sie war notwendig, um eine ausreichende Umwälzung der Zellsuspension zu gewährleisten. Da die Grundbelüftung wegen des geringen Sauerstoff-Verbrauchs im Anfangsstadium der Fermentation höher war, als zur Aufrechterhaltung des DO von 10 % notwendig gewesen wäre, blieb die Belüftungsrate drei Tage lang auf diesem Wert, und der DO von 10 % wurde erst nach drei Tagen erreicht. Die höchste Belüftungsrate wurde am 15. Tag mit 0,34 vvm erreicht. Die weiteren Fermentationsdaten sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Fermentation mit DO = 10 %

| | |
|---|---|
| Zellstamm | R 287 T |
| Fermentationsdauer | 15 Tage |
| pH-Verlauf | 4,6 - 5,8 |
| Animpfmenge als TG | 1,7 g/l |
| TG nach 13 Tagen (15 Tage: 15,3 g/l) | 11,1 g/l |
| PCV nach 13 Tagen (15 Tage: 51,7 %) | 42,3 % |
| Gesamt-Glucose-Verbrauch | 37,9 g/l |
| Glucose-Verbrauch pro g TG | 2,5 g |
| Belüftungsrate (13. Tag: 0,28 vvm) | 0,09 - 0,34 vvm |

1.2 Fermentation mit DO = 20 %

Hier stieg die Belüftungsrate früher an als beim vorangegangenen Versuch, denn schon vor dem 3. Tag war die

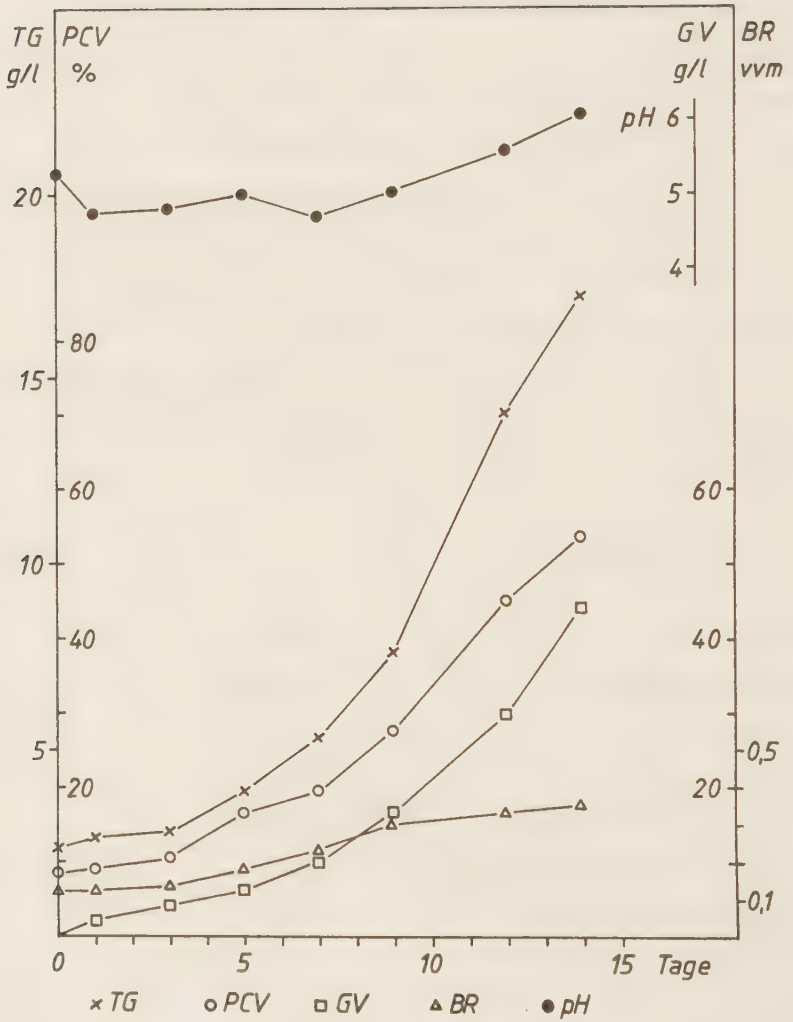



Abb. 5: Fermentation mit Zellstamm R 287 T;
Wachstumsverlauf bei DO = 20 %,
20 l-Airlift-Fermenter

Grundbelüftung nicht mehr ausreichend. Die Belüftungrate blieb insgesamt auf höheren Werten, wenn auch der höchste Wert am 14. Tag mit 0,35 vvm nur geringfügig höher war als bei der Fermentation mit DO = 10 %. Ab dem 9. Tag war eine stärkere Schaumbildung zu erkennen, und ein leichtes Überschäumen war am 12. Tag zu verzeichnen, trat dann aber nach Zugabe von Antischaummmittel nicht mehr auf.
Der Fermentationsverlauf ist in Abb. 5 dargestellt, die Daten sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Tabelle 3: Fermentation mit DO = 20 %

| | |
|---|---|
| Zellstamm | R 287 T |
| Fermentationsdauer | 14 Tage |
| pH-Verlauf | 4,7 - 6,1 |
| Animpfmenge als TG | 2,4 g/l |
| TG nach 13 Tagen (14 Tage: 17,2 g/l) | 15,7 g/l |
| PCV nach 13 Tagen (14 Tage: 53,6 %) | 49,0 % |
| Gesamt-Glucose-Verbrauch | 44,0 g/l |
| Glucose-Verbrauch pro g TG | 2,6 g |
| Belüftungsrate (13. Tag: 0,34 vvm) | 0,12 - 0,35 vvm |

### 1.3 Fermentation mit DO = 30 %

Abb. 6 zeigt den Verlauf dieser Fermentation. Bereits am 2. Tag stieg die Belüftungsrate an und hatte schon am 9. Tag mit 0,38 vvm ihren höchsten Wert erreicht. Sie blieb dann bis zum 13. Tag auf diesem Wert. Auch ist hier ein steilerer Anstieg des Trockengewichts zu beobachten als bei den

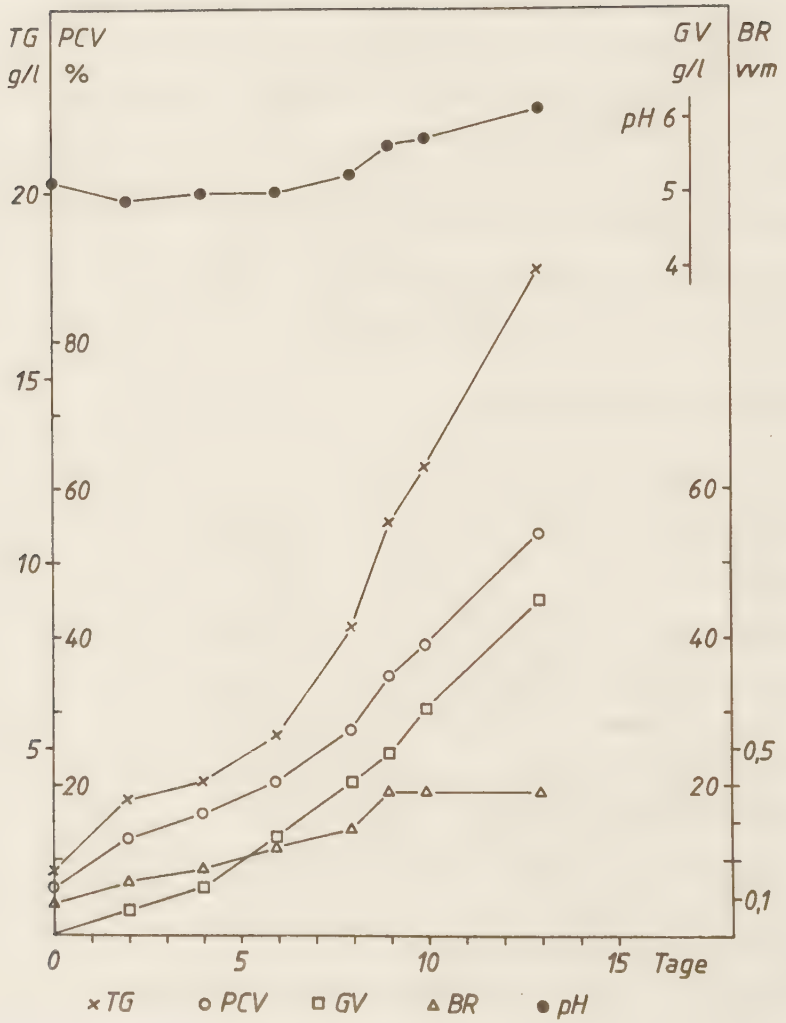



Abb. 6: Fermentation mit Zellstamm R 287 T;
Wachstumsverlauf bei DO = 30 %,
20 l-Airlift-Fermenter

vorangegangenen Fermentationen, welches am 13. Tag 17,9 g/l erreichte. Die Schaumbildung war ebenfalls stärker, bereits am 8. Tag kam es zu einem leichten Überschäumen; durch Zugabe von Antischaummittel konnte weiteres Überschäumen vermieden werden.

Die Fermentationsdaten sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Fermentation mit DO = 30 %

| | |
|---|---|
| Zellstamm | R 287 T |
| Fermentationsdauer | 13 Tage |
| pH-Verlauf | 4,9 - 6,2 |
| Animpfmenge als TG | 1,7 g/l |
| TG nach 13 Tagen | 17,9 g/l |
| PCV nach 13 Tagen | 54,2 % |
| Gesamt-Glucose-Verbrauch | 44,9 g/l |
| Glucose-Verbrauch pro g TG | 2,5 g |
| Belüftungsrate (13. Tag: 0,38 vvm) | 0,08 - 0,38 vvm |

### 1.4 Fermentation mit DO = 40 %

Die Belüftungsrate stieg ebenfalls schon am 2. Tag an, ein deutlicher Anstieg war aber vor allem ab dem 6. Tag zu beobachten, der höchste Wert war am 14. Tag mit 0,5 vvm erreicht. Dies entsprach einer Luftmenge von 600 Nl/h, eine Luftmenge, wie sie für Fermentationen von Digitalis lanata-Zellen im 20 l-Airlift-Fermenter bisher nicht üblich war (zum Vergleich: HELMBOLD 1979: 280 - 350 Nl/h; BARTHLEN 1983: 350 Nl/h).

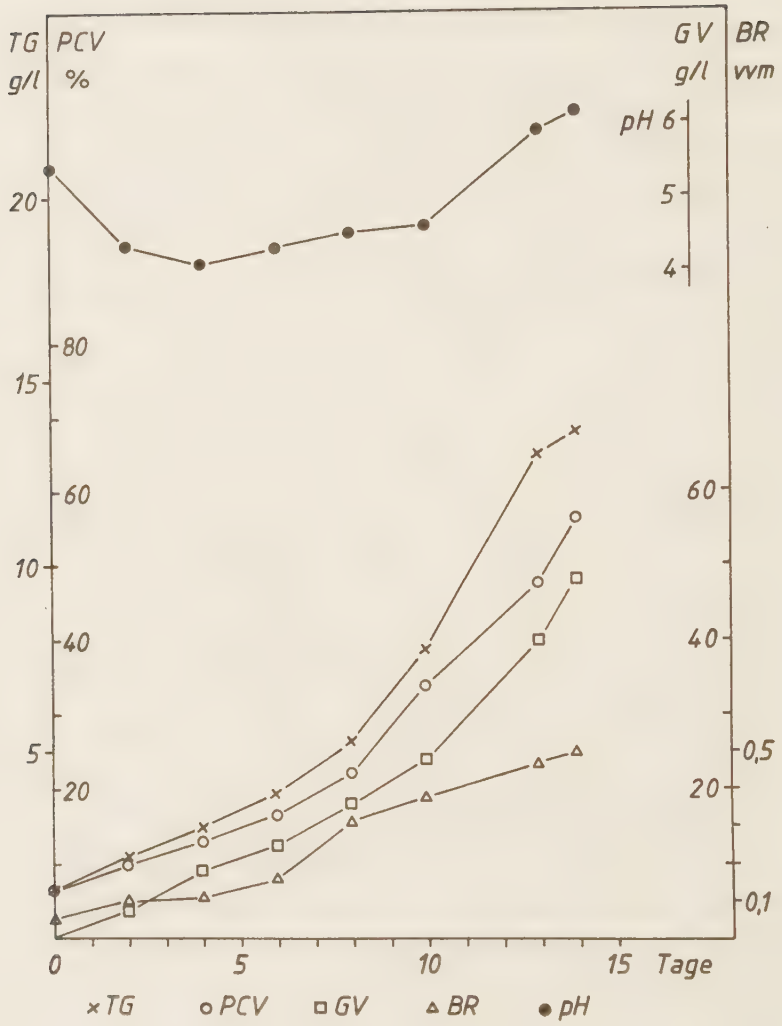



Abb. 7: Fermentation mit Zellstamm R 287 T;
Wachstumsverlauf bei DO = 40 %,
20 l-Airlift-Fermenter

Das Trockengewicht dagegen stieg nur relativ langsam an und blieb gegenüber der Fermentation mit DO = 30 % deutlich zurück. Auffallend war auch der Verbrauch von Glucose pro Gramm Trockengewicht: er lag mit 3,5 g um ca. 1 g höher als bei den anderen Fermentationen.

Aufgrund der geringeren Zellmasse trat eine stärkere Schaumbildung erst am 10. Tag ein, und bis zum 13. Tag sank das Arbeitsvolumen des Fermenters durch starkes Überschäumen auf 18 l ab. Weiteres Überschäumen konnte auch durch Zugabe von Antischaummittel nicht verhindert werden. Die Fermentationsdaten sind in Tabelle 5 aufgeführt, der Verlauf ist in Abb. 7 dargestellt.

Tabelle 5: Fermentation mit DO = 40 %

| | |
|---|---|
| Zellstamm | R 287 T |
| Fermentationsdauer | 14 Tage |
| pH-Verlauf | 4,1 - 6,1 |
| Animpfmenge als TG | 1,3 g/l |
| TG nach 13 Tagen (14 Tage: 13,7 g/l) | 13,0 g/l |
| PCV nach 13 Tagen (14 Tage: 56,4 %) | 47,7 % |
| Gesamt-Glucose-Verbrauch | 48,0 g/l |
| Glucose-Verbrauch pro g TG | 3,5 g |
| Belüftungsrate (13. Tag: 0,47 vvm) | 0,05 - 0,5 vvm |

## 1.5 Spezifische Wachstumsraten und Verdoppelungszeiten

Um das Wachstum zahlenmäßig besser erfassen und vergleichen zu können, wurde bei den vorangegangenen Fermentationen die

Spezifische Wachstumsrate $\mu$ und die Verdoppelungszeit $t_d$ errechnet, beide bezogen auf das Trockengewicht.
Die Werte sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Spezifische Wachstumsraten und Verdoppelungszeiten

| DO | 10 % | 20 % | 30 % | 40 % |
|---|---|---|---|---|
| $\mu$ | 0,15 $d^{-1}$ | 0,17 $d^{-1}$ | 0,20 $d^{-1}$ | 0,17 $d^{-1}$ |
| $t_d$ | 4,7 d | 4,2 d | 3,5 d | 4,2 d |

## 1.6 Diskussion

Das beste Wachstum wurde bei der Fermentation mit DO = 30 % erreicht. Es waren hier sowohl die Zelldichte am höchsten (Trockengewicht 17.9 g l in 13 Tagen) als auch die spezifische Wachstumsrate in der exponentiellen Phase des Wachstums mit 0,20 $d^{-1}$ am besten.
Mit zunehmendem DO und dadurch bedingten höheren Belüftungsraten ist auch mit vermehrter Schaumbildung zu rechnen, vor allem gegen Ende der Fermentationen, wenn bereits höhere Zelldichten erreicht sind. Die Schaumbildung kann zwar durch Zugabe von Antischaummittel zurückgedrängt werden, zu hohe Mengen sollten jedoch vermieden werden. SMART und FOWLER (1981) konnten zeigen, daß durch Zugabe von Antischaummittel bei der Fermentation von Tetrahymena roseus-Zellen der Sauerstoffübergangskoeffizient $k_La$ deutlich absank, d. h. der Übergang des gasförmigen Sauerstoffs in die flüssige Phase war verschlechtert. Dies hatte auch

[illegible] [illegible] [illegible] [

## 2. Vergleich des Wachstums bei verschiedenen Belüftungsarten

Bei diesen Versuchen wurden jeweils zwei 20 l-Airlift-Fermenter gleichzeitg betrieben. Ein Fermenter wurde mit einer konstanten Belüftungsrate von 0,3 vvm belüftet, der andere hingegen so, daß ein DO von 30 % während der gesamten Fermentationsdauer erhalten blieb.

### 2.1 Fermentation mit dem Zellstamm R 287 T

Der Verlauf der Fermentationen ist in Abb. 8 dargestellt. Beide Fermenter wurden mit der Zellsuspension aus je 12 Erlenmeyerkolben angeimpft, so daß sie zu Beginn gleiche Zelldichten hatten. Die Kurven des Trockengewichts verliefen bei beiden Fermentern bis zum 10. Tag nahezu gleich. Ab dem 10. Tag nahm jedoch das Trockengewicht des Fermenters mit Sauerstoff-Regelung (DO = 30 %) stärker zu und erreichte am 13. Tag 17,9 g/l. Zu diesem Zeitpunkt hatte der Fermenter mit der konstanten Belüftungsrate von 0,3 vvm nur ein TG von 15,7 g/l.

Die Spezifische Wachstumsrate $\mu$ ergab in beiden Fällen den Wert 0,20 $d^{-1}$, die Verdoppelungszeit $t_d$ entsprechend 3,4 Tage. Unterschiede gab es lediglich in der Länge der exponentiellen Wachstumsphase.

Die Belüftungsrate des Fermenters mit Sauerstoff-Regelung hatte am 10. Tag 0,36 vvm erreicht und ließ somit darauf schließen, daß die konstanten 0,3 vvm des anderen Fermenters nicht mehr für ein ungehindertes Wachstum ausreichten.

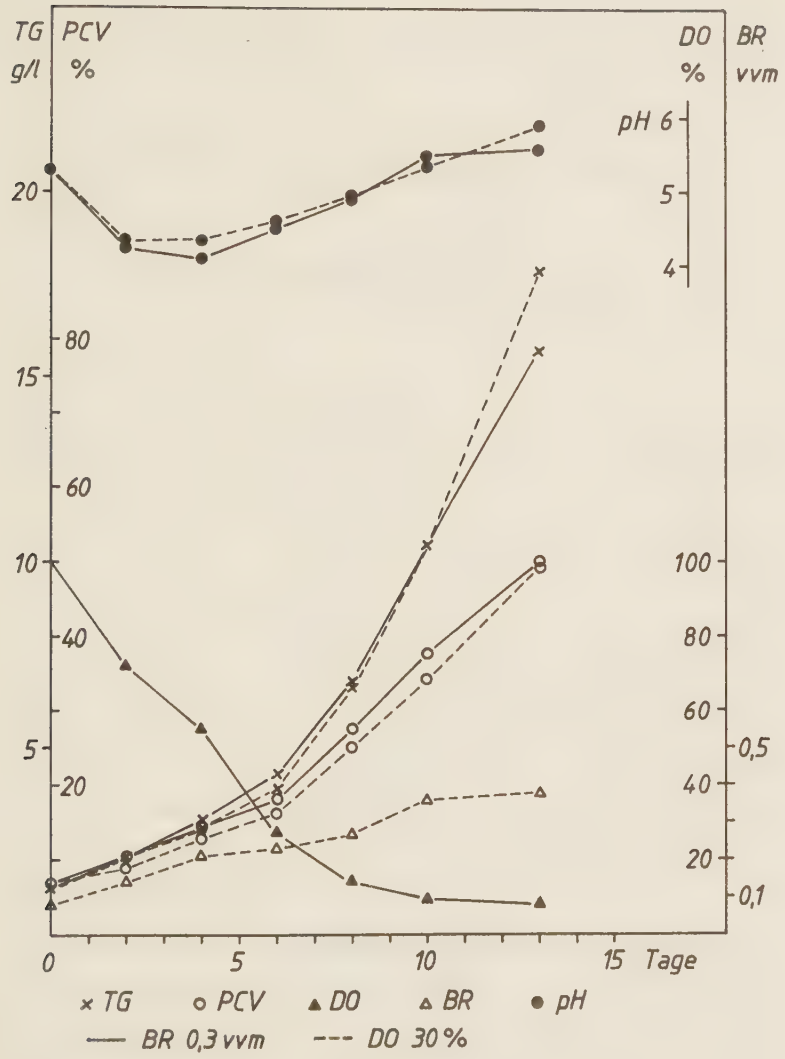



Abb. 8: Fermentation mit Zellstamm R 287 T;
Wachstumsvergleich DO = 30 % / konstante
Belüftungsrate 0,3 vvm, 20 l-Airlift-Fermenter

Durch die Belüftungsrate von 0,3 vvm konnte hier nur noch ein DO von 9 % erreicht werden, der bis zum 13. Tag noch weiter auf 8 % absank.

Die Fermentationsdaten beider Fermentationen sind in Tabelle 7 nochmals zusammengefaßt und gegenübergestellt.

Tabelle 7: Fermentationsdaten des Wachstumsvergleichs mit Zellstamm R 287 T

| DO | konst. 30 % | 100 % - 8 % |
|---|---|---|
| Belüftungsrate | 0,08-0,38 vvm | konst. 0,3 vvm |
| Zellstamm | R 287 T | R 287 T |
| Fermentationsdauer | 13 Tage | 13 Tage |
| pH-Verlauf | 4,3 - 5,9 | 4,1 - 5,6 |
| Animpfmenge als TG | 1,3 g/l | 1,3 g/l |
| TG nach 13 Tagen | 17,9 g/l | 15,7 g/l |
| Spezif. Wachstumsrate | 0,20 $d^{-1}$ | 0,20 $d^{-1}$ |
| PCV nach 13 Tagen | 49,5 % | 50,0 % |
| Gesamt-Glucose-Verbrauch | 46,1 g/l | 39,9 g/l |
| Glucose-Verbrauch pro g TG | 2,6 g | 2,5 g |

## 2.2 Fermentation mit dem Zellstamm 287

Um zu sehen, ob diese Auswirkungen unterschiedlicher Belüftung auch bei Fermentationen mit anderen Zellstämmen von Digitalis lanata erhalten werden, wurden unter sonst gleichen Bedingungen zwei weitere Fermentationen mit dem Zellstamm 287 durchgeführt.

Die Auswertung der Daten, gegenübergestellt in Tabelle 8,

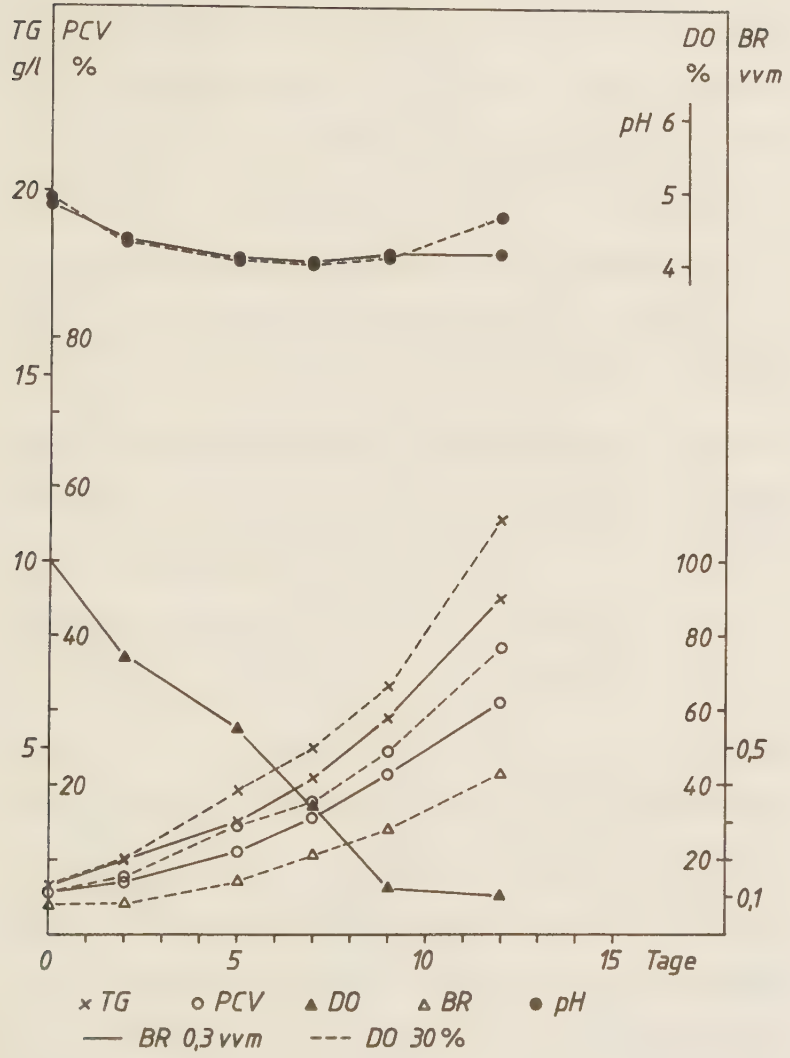



Abb. 9: Fermentation mit Zellstamm 287;
Wachstumsvergleich DO = 30 % / konstante
Belüftungsrate 0,3 vvm, 20 l-Airlift-Fermenter

konnte nur bis zum 12. Tag vorgenommen werden, da bei dem Fermenter mit Sauerstoff-Regelung danach Anzeichen für eine Infektion sichtbar wurden. Bis zu diesem Zeitpunkt zeigte sich bei dem Fermenter mit konstanter Belüftungsrate von 0,3 vvm wiederum ein geringeres Trockengewicht und ebenfalls ein vermindertes Sedimentationsvolumen. Der Unterschied im Wachstum zeigte sich diesmal jedoch schon früher: bereits nach dem 2. Tag waren Unterschiede im Wachstum aufgetreten und vergrößerten sich nochmals zwischen dem 9. und 12. Tag (Abb. 9).

Die Spezifische Wachstumsrate des Fermenters mit DO = 30 % lag mit 0,18 $d^{-1}$ etwas höher als bei dem Fermenter mit konstanter Belüftungsrate ($\mu$ = 0,16 $d^{-1}$).

Tabelle 8: Fermentationsdaten des Wachstumsvergleichs mit Zellstamm 287

| DO | konst. 30 % | 100 % - 10 % |
|---|---|---|
| Belüftungsrate | 0,08-0,43 vvm | konst. 0,3 vvm |
| Zellstamm | 287 | 287 |
| Fermentationsdauer | 12 Tage | 12 Tage |
| pH-Verlauf | 4,0 - 5,1 | 4,0 - 4,8 |
| Animpfmenge als TG | 1,3 g/l | 1,3 g/l |
| TG nach 12 Tagen | 11,1 g/l | 9,0 g/l |
| Spezif. Wachstumsrate | 0,18 $d^{-1}$ | 0,16 $d^{-1}$ |
| PCV nach 12 Tagen | 38,5 % | 31,0 % |
| Gesamt-Glucose-Verbrauch | 26,3 g/l | 20,6 g/l |
| Glucose-Verbrauch pro g TG | 2,4 g | 2,3 g |

2.3 Diskussion

Es hatte sich gezeigt, daß die Art der Belüftung Einflüsse auf das Wachstum und die Ausbeute an Zellmasse hat. Vorteile ergaben sich für die Methode mit Sauerstoff-Regelung, bei der ein DO von 30 % während der gesamten Fermentationsdauer aufrecht erhalten werden konnte. Vor allem am Ende von Fermentationen, wenn bereits höhere Zelldichten erreicht sind, ist hier noch eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Sauerstoff möglich, da die Belüftungsrate entsprechend dem Bedarf an Sauerstoff verändert wird. Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch darin zu sehen, daß unter Umständen sehr hohe Belüftungsraten erreicht werden, die möglicherweise zu einer Schädigung der Zellen führen können. Auch ist dann mit einer stark vermehrten Schaumbildung zu rechnen.

Ein weiterer Vorteil ist aber, daß zu Beginn der Fermentationen die Zellsuspension sehr schonend belüftet und umgewälzt wird. Dies ist deshalb von Bedeutung, weil von verschiedenen Autoren auf die Nachteile zu hoher Belüftung vor allem bei Beginn der Fermentation hingewiesen wird (SMART und FOWLER 1981, CHAUBET 1981). Sie vermuten, daß durch hohe Belüftungsraten Kohlendioxid oder andere für das Wachstum wichtige Substanzen aus dem Nährmedium verdrängt werden. Gerade aber für Suspensions-Kulturen mit geringen Zelldichten konnte gezeigt werden, daß die Anwesenheit von Kohlendioxid zu verbessertem Wachstum führt (NESIUS und FLETCHER 1973, GATHERCOLE et al. 1976).

Verschiedene Arten der Belüftung wurden auch von PAREILLEUX

und CHAUBET (1981) und von PAREILLEUX und VINAS (1983) untersucht. PAREILLEUX und CHAUBET untersuchten das Wachstum von Medicago sativa-Zellsuspensionen und beobachteten, daß eine konstante Belüftungsrate von 0,3 vvm zur Zellschädigung führte und kein Wachstum zu verzeichnen war. Bei einer Fermentation mit DO = 1,5 ppm (das entspricht ca. 20 % Sauerstoffsättigung) durch Sauerstoff-Regelung erhielten sie exponentielles Wachstum.

PAREILLEUX und VINAS fermentierten Catharanthus roseus-Zellen mit DO = 2 ppm (ca. 25 % Sauerstoffsättigung) und erhielten ebenfalls exponentielles Wachstum über fast die gesamte Fermentationsdauer.

## 3. Wachstumsversuche in verschiedenen Fermentern

Die Fermentationen wurden in zwei verschiedenen Fermentern durchgeführt. Verwendet wurden der 20 l-Airlift-Fermenter mit einem Arbeitsvolumen von 20 l und der Biostat U30D-Fermenter mit einem Arbeitsvolumen von 27 l. Beim Biostat U30D handelt es sich um einen für mikrobiologische Fermentationen entwickelten Fermenter, er wurde aber auf Airlift-Betrieb umgerüstet. Er entspricht in seinen Abmessungen der DECHEMA-Betreibernorm für Bioreaktoren (DECHEMA 1982).
Durch die Versuche sollte herausgefunden werden, ob in verschiedenen Fermentern Unterschiede im Wachstum der Zellsuspension festzustellen sind. Die Fermentationen wurden mit verschiedenen Zellstämmen und Belüftungsarten durchgeführt.

### 3.1 Fermentation mit dem Zellstamm 287

Beide Fermenter sollten unter gleichen Bedingungen betrieben werden, lediglich das Arbeitsvolumen war unterschiedlich. Die Belüftungsrate betrug konstant 0,3 vvm während der gesamten Fermentationsdauer. Für das Inoculum wurden beim 20 l-Airlift-Fermenter 12 Erlenmeyerkolben mit je 3oo ml Zellsuspension, beim Biostat U30D 16 Erlenmeyerkolben verwendet, so daß annähernd die gleichen Animpfdichten erhalten wurden.
Die Fermentationsdaten beider Fermentationen sind in Tabelle 9 gegenübergestellt, der Verlauf ist Abb. 10 zu entnehmen.

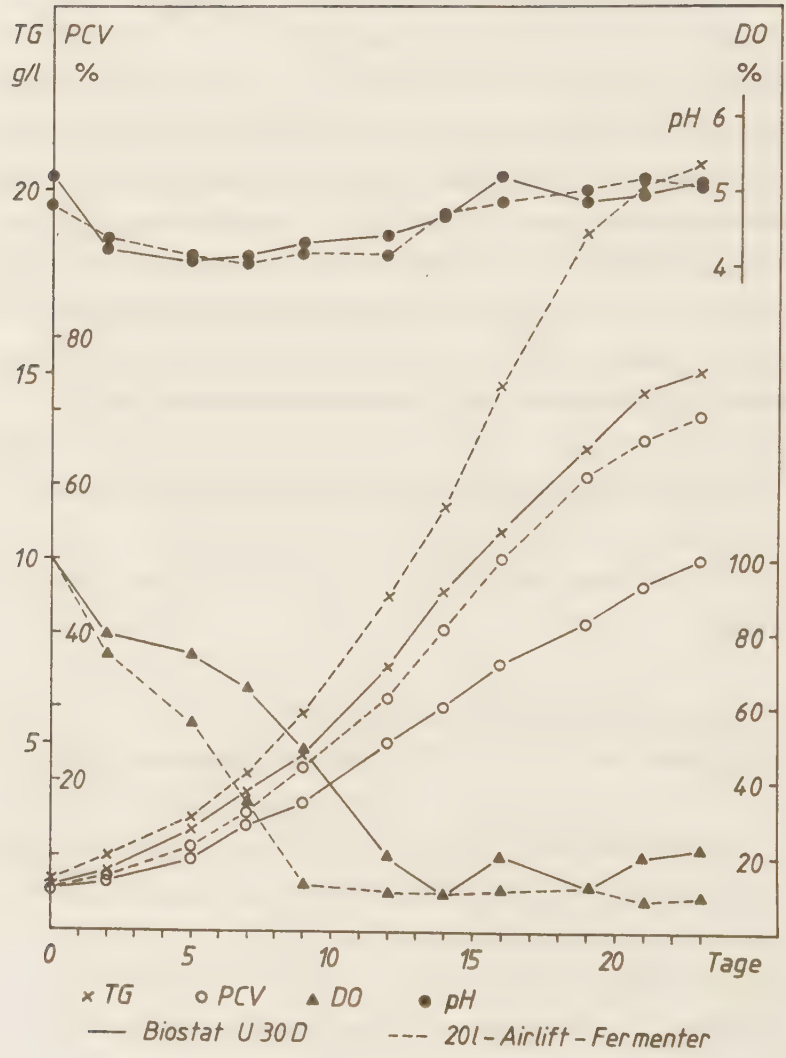



Abb. 10: Fermentation mit Zellstamm 287;
Wachstumsvergleich 20 l-Airlift-Fermenter / Biostat U30D, Belüftungsrate konstant 0,3 vvm

Tabelle 9: Fermentationsdaten zum Wachstumsvergleich in verschiedenen Fermentern

| Fermenter | 20 l-Airlift | Biostat U30D |
|---|---|---|
| Zellstamm | 287 | 287 |
| Fermentationsdauer | 23 Tage | 23 Tage |
| pH-Verlauf | 4,0 - 5,2 | 4,1 - 5,2 |
| Animpfmenge als TG | 1,3 g/l | 1,2 g/l |
| TG nach 23 Tagen | 20,7 g/l | 15,1 g/l |
| Spezif. Wachstumsrate | 0,16 $d^{-1}$ | 0,14 $d^{-1}$ |
| PCV nach 23 Tagen | 69,0 % | 50,0 % |
| Gesamt-Glucose-Verbrauch | 64,1 g/l | 62,0 g/l |
| Glucose-Verbrauch pro g TG | 3,1 g | 4,1 g |
| Belüftungsrate | konst. 0,3 vvm | konst. 0,3 vvm |
| DO | 100 - 8 % | 100 - 10 % |

Sowohl das Trockengewicht als auch das Sedimentationsvolumen lagen beim 20 l-Airlift-Fermenter deutlich höher. Nach 23 Tagen wurde hier ein Trockengewicht von 20,7 g/l erhalten, beim Biostat U30D dagegen nur 15,1 g/l. Der Sauerstoffgehalt im Nährmedium sank beim 20 l-Airlift-Fermenter entsprechend dem besseren Wachstum schneller ab und blieb ab dem 9. Tag auf ca. 10 % bis zum Ende der Fermentation. Beim Biostat U30D wurde dieser Wert erst nach 14 Tagen erreicht und schwankte bis zum 23. Tag zwischen 10 und 20 %. Auffallend war beim Biostat U30D auch der hohe Glucose-Verbrauch: die Zellen verbrauchten pro g Trockengewicht ca. 1 g Glucose mehr als im 20 l-Airlift-Fermenter. Die

Unterschiede im Wachstum ließen sich auch bei den Spezifischen Wachstumsraten erkennen: beim 20 l-Airlift-Fermenter betrug sie 0,16 $d^{-1}$, die Verdoppelungszeit 4,5 Tage. Der Biostat U30D erreichte folgende Werte: Spezifische Wachstumsrate 0,14 $d^{-1}$, Verdoppelungszeit 4,8 Tage.

3.2 Fermentation mit dem Zellstamm 287-DRB-A1/10

Bei diesen Versuchen wurde mit dem durch Selektion gewonnenen Zellstamm 287-DRB-A1/10 gearbeitet. Er hatte gegenüber den bisher verwendeten Zellstämmen eine bessere Biotransformationsfähigkeit. Dies war für diese Versuche zwar nicht von Bedeutung, da aber auch noch Fermentationen mit Substratzugabe vorgesehen waren, sollte er hier schon für Wachstumsversuche eingesetzt werden, um sein Verhalten im Fermenter kennenzulernen.

Die Belüftung erfolgte durch Sauerstoff-Regelung mit DO = 30 % während der gesamten Fermentationsdauer. Abb. 11 zeigt den Verlauf der Fermentationen.

Auch hier erreichte der 20 l-Airlift-Fermenter ein höheres Trockengewicht; vor allem in der ersten Hälfte der Fermentation vergrößerte sich der Unterschied der beiden Kurven, ab dem 9. Tag hatten beide Fermenter etwa den gleichen Zuwachs an Zellmasse. Die Spezifische Wachstumsrate $\mu$ betrug beim 20 l-Airlift-Fermenter 0,22 $d^{-1}$ und war damit deutlich höher als beim Biostat U30D ($\mu$ = 0,17 $d^{-1}$). Die Phase des exponentiellen Wachstums endete jedoch beim 20 l-Airlift-Fermenter schon nach 9 Tagen, während sie beim anderen Fermenter bis zum 12. Tag andauerte.

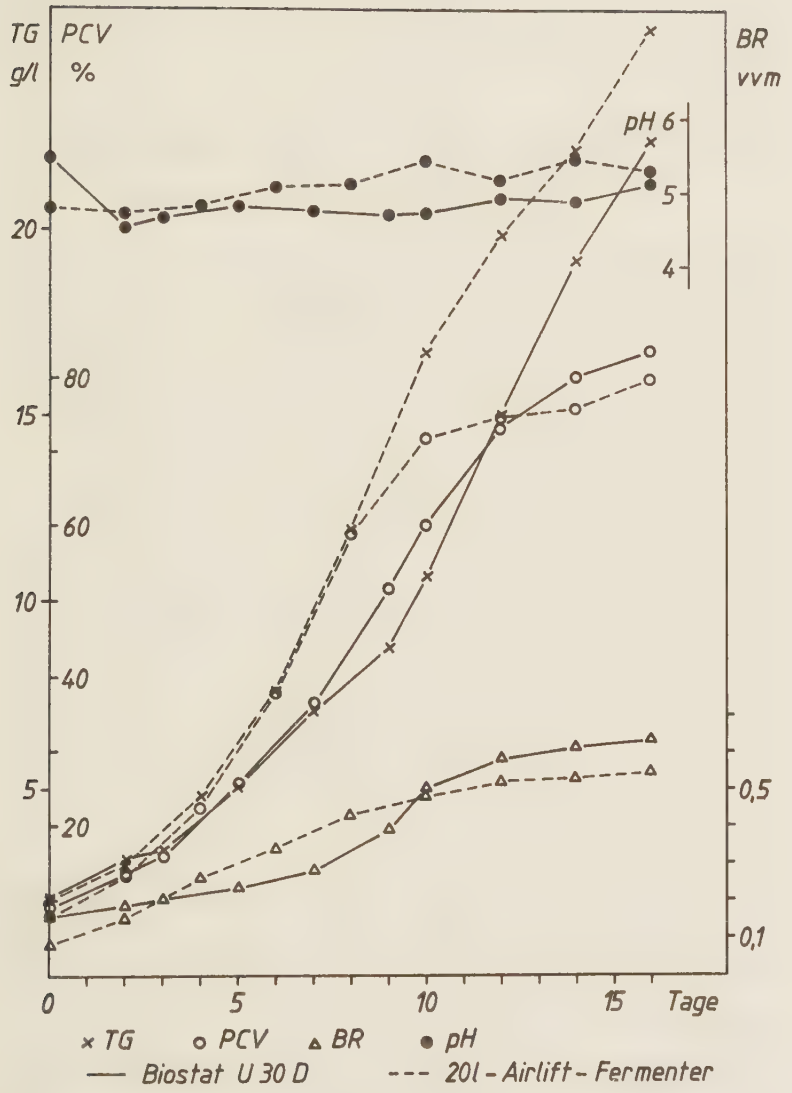



Abb. 11: Fermentation mit Zellstamm 287-DRB-A1/10;
Wachstumsvergleich 20 l-Airlift-Fermenter /
Biostat U30D, DO konstant 30 %

Weitere Daten zu beiden Fermentern sind aus Tabelle 10 zu entnehmen.

Tabelle 10: Fermentationsdaten zum Wachstumsvergleich in verschiedenen Fermentern

| Fermenter | 20 l-Airlift | Biostat U30D |
|---|---|---|
| Zellstamm | 287-DRB-A1/10 | 287-DRB-A1/10 |
| Fermentationsdauer | 16 Tage | 16 Tage |
| pH-Verlauf | 4,7 - 5,4 | 4,5 - 5,5 |
| Animpfmenge als TG | 2,0 g/l | 2,1 g/l |
| TG nach 16 Tagen | 25,5 g/l | 22,4 g/l |
| Spezif. Wachstumsrate | 0,22 $d^{-1}$ | 0,17 $d^{-1}$ |
| PCV nach 16 Tagen | 80,0 % | 83,5 % |
| Gesamt-Glucose-Verbrauch | 59,5 g/l | 54,6 g/l |
| Glucose-Verbrauch pro g TG | 2,3 g | 2,4 g |
| Belüftungsrate | 0,08-0,55 vvm | 0,15-0,63 vvm |
| DO | konst. 30 % | konst. 30 % |

## 3.3 Diskussion

Vergleichende Untersuchungen über das Wachstum von Zellkulturen in unterschiedlichen Fermentern sind in der Literatur mehrfach beschrieben worden. Meist werden jedoch verschiedene Rühr- und Belüftungssysteme oder Fermentergrößen im Hinblick auf ein Scale-up untersucht. WAHL (1977) verglich das Wachstum von Digitalis lanata-Zellen in Fermentern mit Rührern und Airlift-Fermentern. VOGELMANN et al. (1978) und WAGNER und VOGELMANN (1977) machten entsprechende Unter-

suchungen mit Morinda citrifolia-Zellkulturen, ebenso TANAKA (1981) mit Cudrania tricuspidata-Zellen. KATO et al. (1976) untersuchten das Wachstum von Nicotiana tabacum-Zellen in Fermentern mit 15, 360 und 1500 l Volumen für ein Scale-up. Weitere Arbeiten sind von SCHMAUDER und KOBLITZ (1980) in einer Übersicht zusammengefaßt.

Bei den hier durchgeführten Versuchen ging es jedoch darum, das Wachstum in zwei vom Prinzip her gleich aufgebauten Fermentern zu untersuchen, die sich auch im Arbeitsvolumen nicht wesentlich voneinander unterschieden. Trotz gleicher Fermentationsbedingungen ergaben sich Unterschiede im Wachstum. Beim Biostat U30D bildete sich im Verlauf der Fermentation ein starker Randbewuchs oberhalb des Flüssigkeitsspiegels. Diese Zellmasse konnte nicht in das Nährmedium zurückgebracht werden und wurde somit bei der Probenahme auch nicht erfaßt. Auch war ein Absterben dieser Zellen nicht zu vermeiden. Beim 20 l-Airlift-Fermenter war ebenfalls ein Randbewuchs zu beobachten; dieser konnte jedoch durch vorsichtiges Schütteln des gesamten Fermenters in das Nährmedium zurückgeführt werden und war für die weitere Vermehrung der Zellen nicht verloren.

Die Unterschiede im Wachstum der Digitalis lanata-Zellen resultierten daher weniger aus den geometrischen Verhältnissen als vielmehr aus der Handhabung der beiden Fermenter, die beim 20 l-Airlift-Fermenter durch seine Bewegbarkeit erleichtert war. Für größere Airlift-Fermenter, die nicht bewegt werden können, wäre somit eine Abstreif-Vorrichtung zur Verhinderung des Randbewuchses zu fordern.

## 4. Einfluß des gelösten Sauerstoffs auf die 12ß-Hydroxylierung von ß-Methyldigitoxin

Nachdem sich gezeigt hatte, daß der im Nährmedium gelöste Sauerstoff das Wachstum von Digitalis lanata-Zellen beeinflußt, sollte mit den folgenden Versuchen geklärt werden, welchen Einfluß der Sauerstoff auf die Biotransformationsfähigkeit der Zellen hat.

Die Versuche wurden im 20 l-Airlift-Fermenter durchgeführt; zur Verwendung kamen die beiden Zellstämme 287-DRB-A1/10 bzw. 10/56-S-50-Se. Die Substratzugabe (MDt) erfolgte nicht gleich zu Beginn, sondern erst, wenn das Sedimentationsvolumen ca. 15 % erreicht hatte, um der Zellkultur ein ungestörtes Anwachsen zu ermöglichen. Der MDt-Spiegel im Nährmedium wurde durch mehrmalige Zugabe kleiner MDt-Mengen (ca.100 mg) über den Tag verteilt auf ca. 40 mg/l gehalten.

### 4.1 Hydroxylierung bei DO = 30 %

Da sich für das Wachstum ein DO von 30 % als günstig erwies, sollte auch die Hydroxylierung unter diesen Bedingungen untersucht werden. Das Ziel dieser Fermentation mit dem Zellstamm 287-DRB-A1/10 war, die Ergebnisse mit der Fermentation des gleichen Zellstamms ohne Substratzugabe zu vergleichen (siehe Kapitel 3.2) bzw. mit der folgenden Fermentation, bei der vorgesehen war, die Luftzufuhr stark zu reduzieren und die Fermentation bei einem DO von 5 % auszuführen.

Die erste Substratzugabe erfolgte bereits nach dem 2.Tag

bei einem PCV von 13 %. Dabei zeigte sich, daß dies negative Auswirkungen auf das Wachstum hatte. Bis zum 8. Tag war nur ein lineares Wachstum der Zellkultur zu beobachten, erst danach stieg das Trockengewicht stärker an (Abb. 12). Zum Vergleich: der Fermenter ohne MDt-Zugabe hatte am 8. Tag ein Trockengewicht von 11,9 g/l (Abb. 11), der Fermenter mit MDt-Zugabe erreichte bis zu diesem Zeitpunkt nur 6,2 g/l (Abb. 12). Aufgrund des schlechteren Wachstums blieben auch die Belüftungsraten niedriger und erreichten mit 0,29 vvm ihren höchsten Wert, während beim Fermenter ohne MDt-Zugabe Werte bis 0,55 vvm erhalten wurden. Die Hydroxylierung hingegen war trotz des schlechteren Wachstums zufriedenstellend: am 16. Tag war ein MDg-Spiegel von über 500 mg/l im Nährmedium erreicht. Danach war bis zum 21. Tag nur noch eine relativ geringe Zunahme zu messen, denn der Endwert betrug 585,8 mg/l.

Das Trockengewicht betrug am Ende der Fermentation 23,6 g/l, während bei der Fermentation ohne MDt-Zugabe bereits nach 16 Tagen ein Trockengewicht von 25,5 g/l erreicht war. Die Schaumbildung ist erfahrungsgemäß bei Fermentationen mit MDt-Zugabe verstärkt, und so war ab dem 13. Tag trotz Zugabe von Antischaummittel mehrmals ein Überschäumen zu beobachten. Am Ende der Fermentation betrug das Arbeitsvolumen des Fermenters nur noch 18 l. Ein Ergänzen mit Wasser auf das ursprüngliche Arbeitsvolumen von 20 l wurde nicht unternommen, um die Konzentrationsverhältnisse im Nährmedium nicht zu verändern. Die übrigen Werte dieser Fermentation sind in Tabelle 11 zusammengestellt.

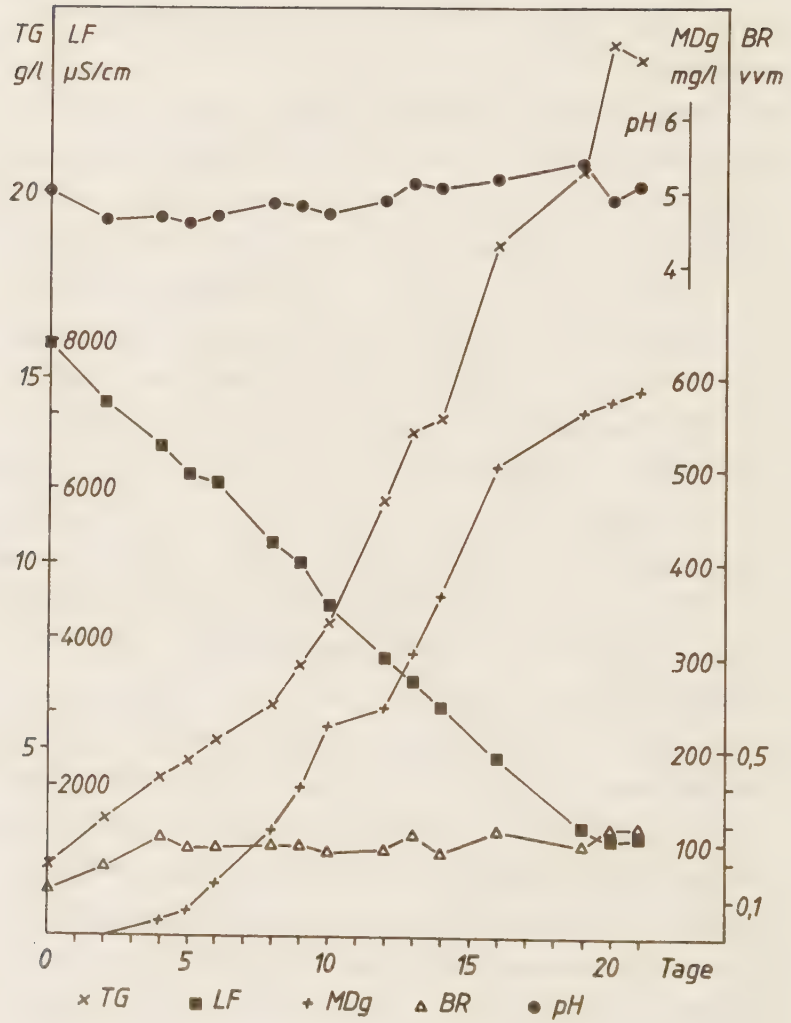



Abb. 12: Fermentation mit MDt-Zugabe;
20 l-Airlift-Fermenter, Zellstamm 287-DRB-A1/10,
DO = 30 %

Tabelle 11: Fermentation mit MDt-Zugabe (DO = 30 %)

| | |
|---|---|
| Zellstamm | 287-DRB-A1/10 |
| Fermentationsdauer | 21 Tage |
| pH-Verlauf | 4,6 - 5,4 |
| Animpfmenge als TG | 1,9 g/l |
| TG nach 21 Tagen | 23,6 g/l |
| PCV nach 21 Tagen | 73,0 % |
| Gesamt-Glucose-Verbrauch | 67,6 g/l |
| Glucose-Verbrauch pro g TG | 2,9 g |
| Belüftungsrate | 0,12 - 0,29 vvm |
| DO | konst. 30 % |
| MDg nach 19 Inkubationstagen | 585,8 mg/l |
| Durchschnittlicher MDt-Spiegel im Nährmedium | ca. 40 mg/l |

4.2 Hydroxylierung bei DO = 5 %

Diese Fermentation ist als Vorversuch anzusehen, da hier eine sehr starke Reduktion der Sauerstoff-Versorgung vorgenommen wurde. Wenn der Gehalt an gelöstem Sauerstoff im Nährmedium Auswirkungen auf die Hydroxylierung von MDt zu MDg haben sollte, so mußte dieser Effekt hier deutlich zu Tage treten.

Die erste Substratzugabe erfolgte ebenfalls bereits nach dem 2. Tag, um gleiche Voraussetzungen wie beim vorangegangenen Versuch zu schaffen. Wiederum war nur ein lineares Wachstum zu beobachten; die Zunahme des Trockengewichts war aber wegen des niedrigen DO von 5 % noch geringer, und

zwischen dem 6. und 7. Tag war fast gar keine Zunahme des Trockengewichts zu messen.

Die Hydroxylierung kam ebenfalls nur sehr langsam in Gang, denn am 7. Tag war ein MDg-Gehalt von 29,4 mg/l im Nährmedium zu messen. Zu diesem Zeitpunkt waren bei der Fermentation mit DO = 30 % bereits ca. 85 mg MDg/l vorhanden. Die verringerte Hydroxylierung kann aber nicht nur durch die verminderte Zellmasse verursacht sein, da das Trockengewicht zu diesem Zeitpunkt nur um ca. 15 % geringer war als bei der Fermentation mit DO = 30 %, der MDg-Gehalt aber nur ca. 1/3 betrug.

Um diese Fermentation nicht durch Sauerstoff-Mangel vorzeitig beenden zu müssen, wurde ab dem 7. Tag der DO von 5 auf 30 % erhöht. Sowohl das Trockengewicht als auch die Hydroxylierung stiegen an, und die Zunahmen sind mit den Werten der vorangegangenen Fermentation vergleichbar. Die Fermentation mußte wegen des starken Überschäumens des Fermenters jedoch am 16. Tag bei einem MDg-Gehalt von 377,6 mg/l abgebrochen werden.

Der Verlauf der Fermentation ist in Abb. 13 dargestellt, die dazugehörigen Daten sind in Tabelle 12 aufgeführt.

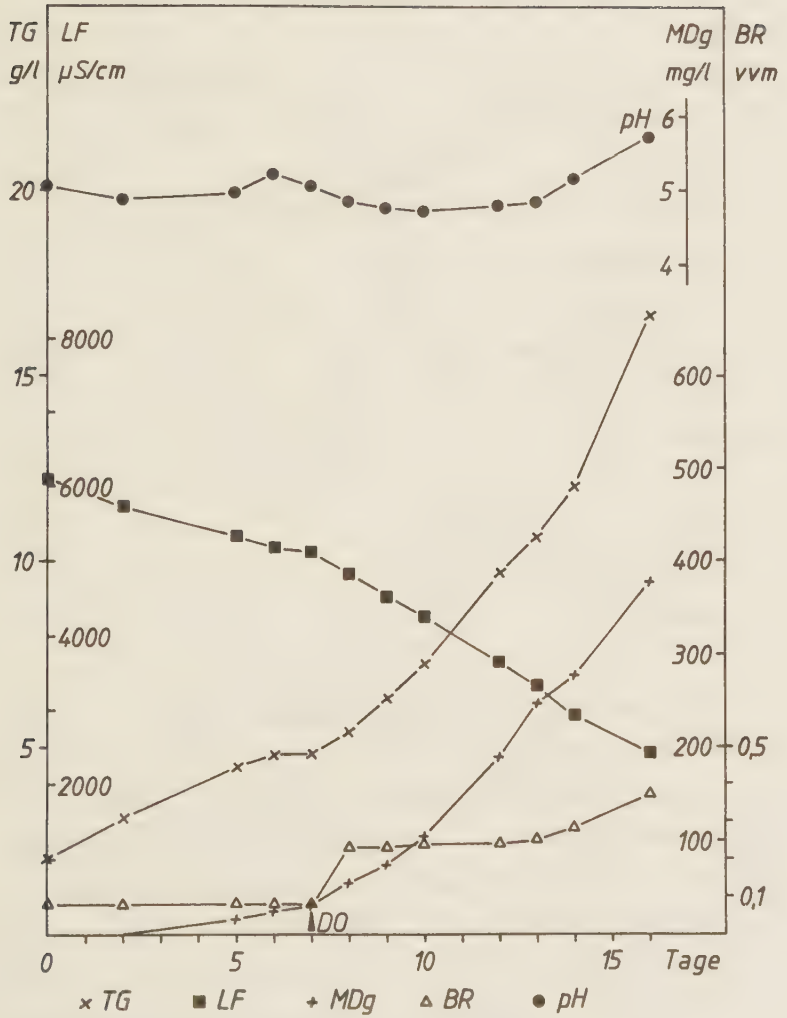



Abb. 13: Fermentation mit MDt-Zugabe;
20 l-Airlift-Fermenter, Zellstamm 287-DRB-A1/10,
DO anfänglich 5 %, nach 7 Tagen auf 30 %
erhöht

Tabelle 12: Fermentation mit MDt-Zugabe (DO = 5 %)

| | |
|---|---|
| Zellstamm | 287-DRB-A1/10 |
| Fermentationsdauer | 16 Tage |
| pH-Verlauf | 4,7 - 5,8 |
| Animpfmenge als TG | 2,0 g/l |
| TG nach 16 Tagen | 16,6 g/l |
| PCV nach 16 Tagen | 77,0 % |
| Gesamt-Glucose-Verbrauch | 35,2 g/l |
| Glucose-Verbrauch pro g TG | 2,1 g |
| Belüftungsrate | 0,08 - 0,37 vvm |
| DO | 5 % / 30 % |
| MDg nach 14 Inkubationstagen | 377,6 mg/l |
| Durchschnittlicher MDt-Spiegel im Nährmedium | ca. 40 mg/l |

## 4.3 Absenken des DO während der Fermentation

Nachdem sich im vorherigen Versuch Hinweise ergaben, daß die Hydroxylierung vom Sauerstoffgehalt im Nährmedium abhängt, sollte dies im folgenden Versuch näher untersucht werden. Zwei Fermenter wurden parallel unter anfänglich gleichen Bedingungen betrieben, beide mit einem DO von 30 %. Ein Fermenter diente als Vergleichsfermenter, bei dem dieser DO von 30 % während der gesamten Fermentationsdauer erhalten blieb. Beim anderen Fermenter wurde nach 7 Tagen der DO von 30 auf 10 % abgesenkt. Bis zu diesem Zeitpunkt zeigten beide Fermenter fast gleiches Wachstum und gleiche Hydroxylierung (Abb. 14), nach Absenken des DO auf 10 %

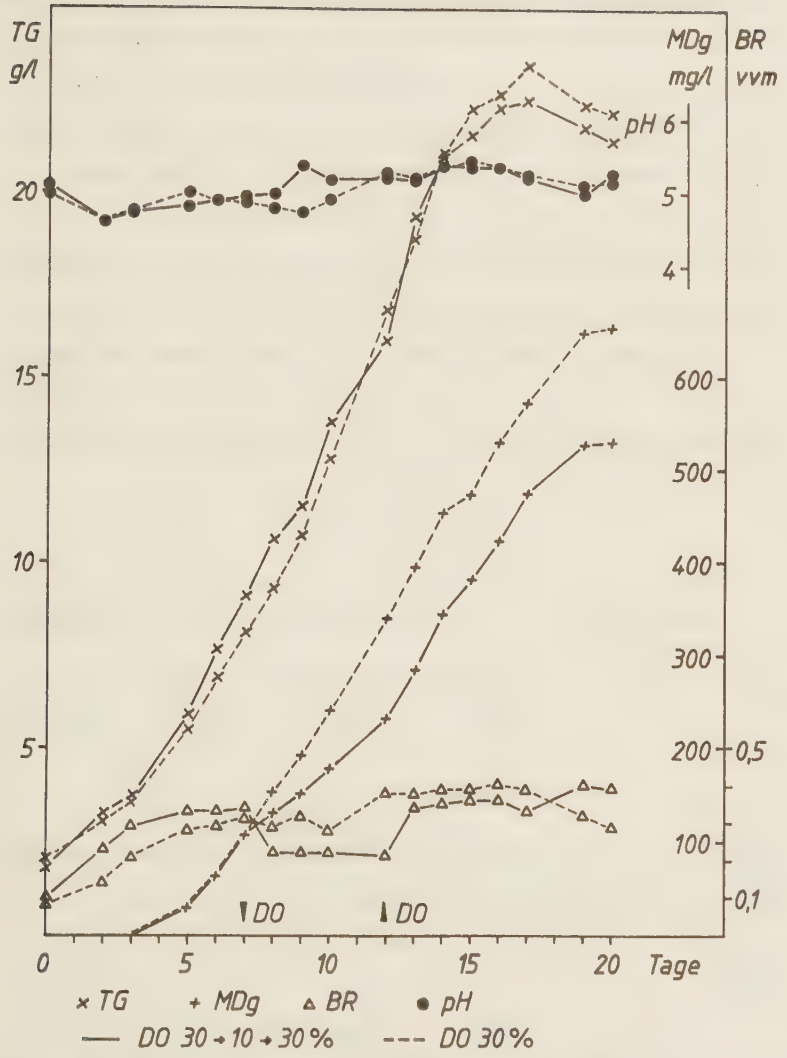



Abb. 14: Einfluß des DO auf die Hydroxylierung;
20 l-Airlift-Fermenter, Zellstamm 287-DRB-A1/10,
DO = 30 %, zwischen 7. und 12. Tag auf 10 % abgesenkt (Vergleichsfermenter: DO konstant 30 %)

nahm jedoch die Hydroxylierung deutlich ab. Am 12. Tag wurde der DO wieder auf 30 % erhöht, um zu sehen, ob dieser Effekt reversibel ist. Die Hydroxylierung stieg wieder an, und auch die Belüftungsrate erreichte die vorherigen Werte. Besser sichtbar wird die Auswirkung des abgesenkten DO, wenn man die täglichen Hydroxylierungsraten betrachtet (Abb. 15). Während beim Vergleichsfermenter in dieser Zeit täglich MDt-Mengen zwischen 40 und 50 mg/l hydroxyliert wurden, waren es beim Fermenter mit vermindertem Sauerstoffgehalt nur Werte um 25 mg/l. Ab dem 12. Tag, nach der Erhöhung des DO, hatten beide Fermenter wieder ähnliche Hydroxylierungsraten.

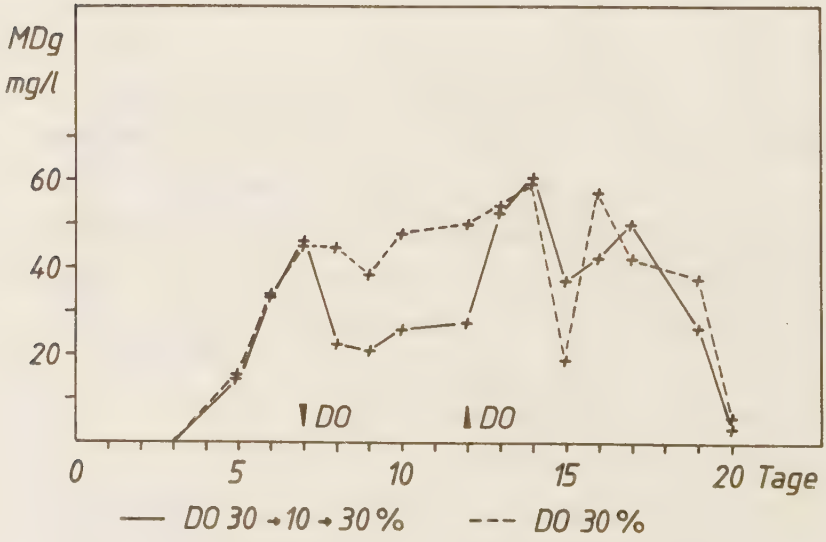



Abb. 15: Tägliche Hydroxylierungsraten bei Absenken des DO

Die Angaben zu beiden Fermentern sind in Tabelle 13 gegenübergestellt.

Tabelle 13: Fermentation mit Absenkung des DO

| DO | konst. 30 % | 30 / 10 / 30 % |
|---|---|---|
| Belüftungsrate | 0,08-0,40 vvm | 0,10-0,40 vvm |
| Zellstamm | 287-DRB-A1/10 | 287-DRB-A1/10 |
| Fermentationsdauer | 20 Tage | 20 Tage |
| pH-Verlauf | 4,6 - 5,5 | 4,6 - 5,4 |
| Animpfmenge als TG | 2,1 g/l | 1,9 g/l |
| TG nach 20 Tagen | 22,2 g/l | 21,4 g/l |
| PCV nach 20 Tagen | 78,5 % | 78,0 % |
| Gesamt-Glucose-Verbrauch | 75,2 g/l | 74,2 g/l |
| Glucose-Verbrauch pro g TG | 3,4 g | 3,5 g |
| MDg nach 17 Inkubationstagen | 654,2 mg/l | 529,8 mg/l |
| Durchschnittl. MDt-Spiegel im Nährmedium | ca. 40 mg/l | ca. 40 mg/l |

Dieser Versuch wurde 10 Monate später wiederholt. Da sich aber in dieser Zeit die Hydroxylierungsfähigkeit des Zellstamms insgesamt verschlechtert hatte, war die Abnahme der Hydroxylierung nach Absenken des DO nicht so deutlich ausgeprägt, aber dennoch vorhanden (Abb. 16).
Dies ist auch aus Abb. 17 ersichtlich, wo wiederum die täglichen Hydroxylierungsraten dargestellt sind.
Nach 8 Tagen Fermentation unter gleichen Bedingungen wurde der DO bei einem Fermenter von 30 auf 10 % abgesenkt und am

15. Tag wieder auf den ursprünglichen Wert erhöht. Die täglichen Hydroxylierungsraten sind beim Fermenter mit geringerem Sauerstoffgehalt in dieser Zeit um durchschnittlich 5 mg/l niedriger als beim Vergleichsfermenter. Weitere Fermentationsdaten beider Fermenter sind in Tabelle 14 zusammengefaßt.

Tabelle 14: Fermentation mit Absenkung des DO

| DO | konst. 30 % | 30 / 10 / 30 % |
|---|---|---|
| Belüftungsrate | 0,08-0,32 vvm | 0,10-0,33 vvm |
| Zellstamm | 287-DRB-A1/10 | 287-DRB-A1/10 |
| Fermentationsdauer | 18 Tage | 18 Tage |
| pH-Verlauf | 4,5 - 5,6 | 4,5 - 5,4 |
| Animpfmenge als TG | 1,9 g/l | 1,8 g/l |
| TG nach 18 Tagen | 23,4 g/l | 22,3 g/l |
| PCV nach 18 Tagen | 85,0 % | 85,0 % |
| Gesamt-Glucose-Verbrauch | 59,3 g/l | 54,7 g/l |
| Glucose-Verbrauch pro g TG | 2,5 g | 2,5 g |
| MDg nach 16 Inkubationstagen | 276,3 mg/l | 256,1 mg/l |
| Durchschnittl. MDt-Spiegel im Nährmedium | ca. 40 mg/l | ca. 40 mg/l |

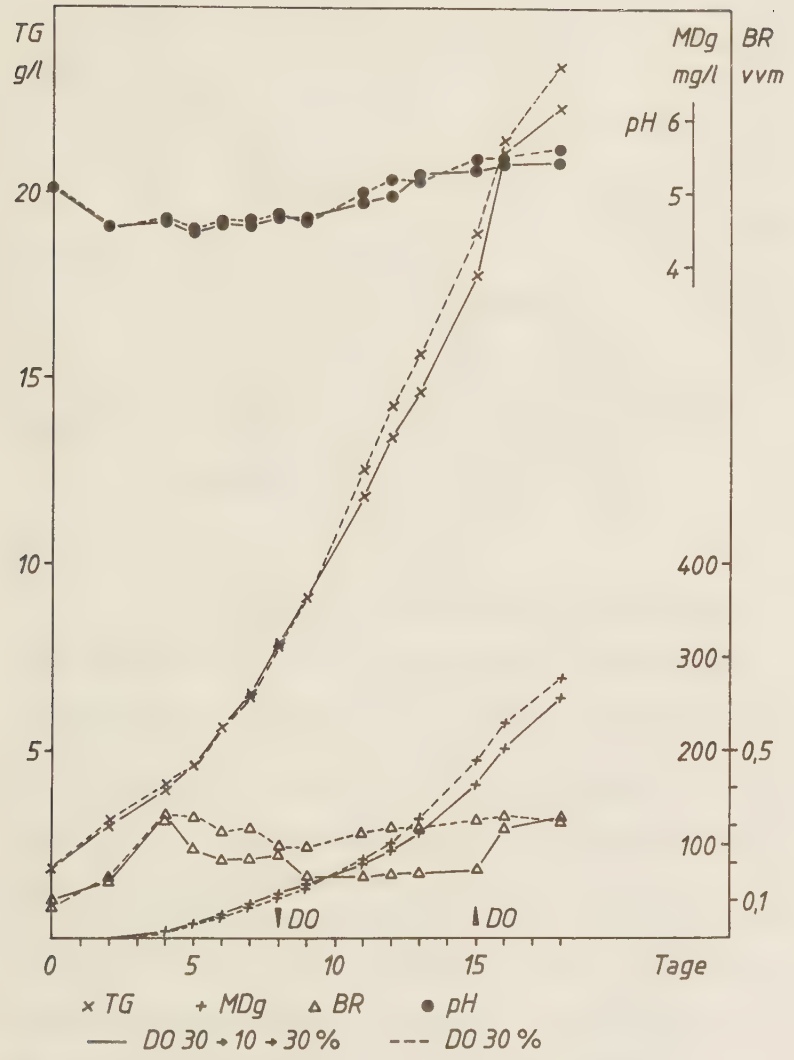



Abb. 16: Einfluß des DO auf die Hydroxylierung;
20 l-Airlift-Fermenter, Zellstamm 287-DRB-A1/10,
DO = 30 %, zwischen 8. und 15. Tag auf 10 % abgesenkt (Vergleichsfermenter: DO konstant 30 %)

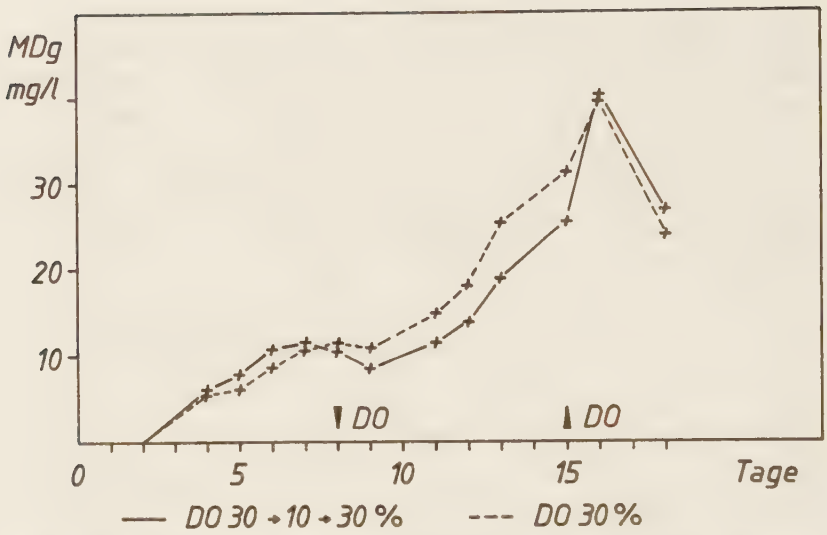



Abb. 17: Tägliche Hydroxylierungsraten bei Absenken des DO

4.4 Erhöhung des Sauerstoffgehalts im Nährmedium

Bei den folgenden Versuchen sollten die Auswirkungen einer Erhöhung des DO von 30 auf 50 % untersucht werden. Da bei einem DO von 50 % jedoch die Gefahr bestand, daß die Zellen durch zu hohe Belüftungsraten und damit verbunden eine zu starke Umwälzung geschädigt würden, mußte bei diesen Fermentationen reiner Sauerstoff zur Zuluft zugemischt werden. Auf diese Weise war eine ausreichende Sauerstoff-Versorgung bei dennoch schonender Umwälzung der Zellen im Fermenter möglich. Zur besseren Vergleichbarkeit beziehen sich daher in den Abbildungen 18 - 20 die Belüftungsraten (vvm) nicht auf die Luftmenge, sondern sind als reiner Sauerstoff berechnet.

4.4.1 Fermentation mit DO = 50 %

Es wurden zwei Fermenter parallel betrieben: einer mit einem DO von 50 % von Beginn der Fermentation an, der zweite diente als Vergleichsfermenter mit einem DO von 30 %. Die übrigen Bedingungen waren für beide Fermenter gleich. Beim Fermenter mit höherem Sauerstoffgehalt wurde ab dem 8. Tag reiner Sauerstoff zur Zuluft beigemischt, da die Belüftungsrate bei über 0,3 vvm Luft lag und ein weiteres Ansteigen vermieden werden sollte. Die Belüftungsrate wurde auf ca. 0,2 vvm Luft reduziert, die zusätzlich notwendige Sauerstoffmenge betrug zwischen 40 und 65 l Sauerstoff pro Stunde.

Tabelle 15: Hydroxylierungsvergleich bei erhöhtem DO

| DO | konst. 30 % | konst. 50 % |
|---|---|---|
| Belüftungsrate (Sauerstoff) | 0,015-0,078vvm | 0,023-0,091vvm |
| Zellstamm | 287-DRB-A1/10 | 287-DRB-A1/10 |
| Fermentationsdauer | 14 Tage | 14 Tage |
| pH-Verlauf | 4,7 - 5,3 | 4,7 - 5,2 |
| Animpfmenge als TG | 1,6 g/l | 1,6 g/l |
| TG nach 14 Tagen | 21,9 g/l | 20,2 g/l |
| PCV nach 14 Tagen | 82,0 % | 84,0 % |
| Gesamt-Glucose-Verbrauch | 51,3 g/l | 50,0 g/l |
| Glucose-Verbrauch pro g TG | 2,3 g | 2,5 g |
| MDg nach 12 Inkubationstagen | 320,9 mg/l | 343,9 mg/l |
| Durchschnittl. MDt-Spiegel im Nährmedium | ca. 40 mg/l | ca. 40 mg/l |

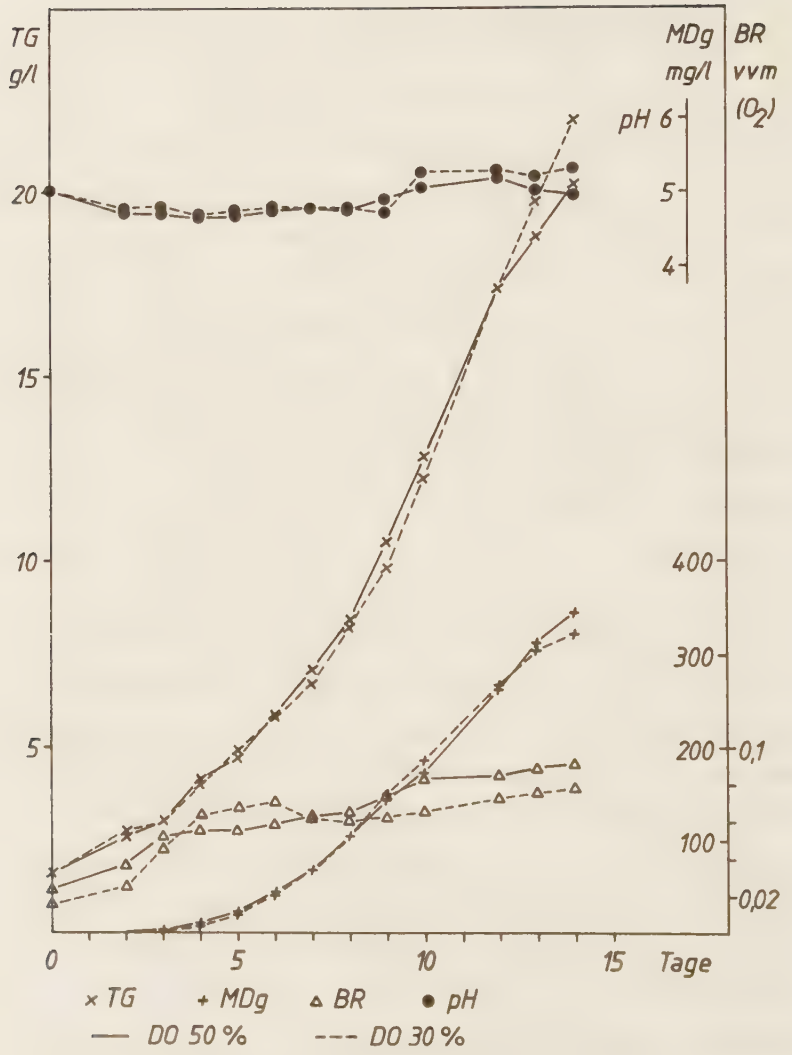



Abb. 18: Einfluß des DO auf die Hydroxylierung;
20 l-Airlift-Fermenter, Zellstamm 287-DRB-A1/10,
DO konstant 50 %
(Vergleichsfermenter: DO konstant 30 %)

Der Verlauf der Fermentationen zeigt in Abb. 18, daß sowohl das Trockengewicht als auch der MDg-Gehalt bei beiden Fermentern über fast die gesamte Fermentationsdauer gleich waren. Die Erhöhung des Sauerstoffgehalts im Nährmedium brachte bei diesem Versuch also keine Verbesserung der Hydroxylierung. Zum Vergleich sind die erreichten Fermentationswerte in Tabelle 15 aufgeführt.

4.4.2 Erhöhen des DO während der Fermentation

Ähnlich wie bei den Versuchen in Kapitel 4.3 sollte hier der Sauerstoffgehalt im Nährmedium während der Fermentation verändert werden. Es wurden wiederum zwei Fermenter bis zum 8. Tag unter gleichen Bedingungen betrieben (DO = 30 %), Trockengewichtskurve und MDg-Gehalt verliefen bis zu diesem Zeitpunkt auch weitgehend gleich (Abb. 19). Die erste MDt-Zugabe erfolgte erst nach dem 3. Tag, um das Wachstum der Zellen nicht in einem zu frühen Stadium zu behindern. Die Belüftung erfolgte bis zum 8. Tag bei beiden Fermentern nur durch Luft. Ab dem 8. Tag wurde bei einem Fermenter der DO auf 50 % erhöht, der Vergleichsfermenter wurde auf einem DO von 30 % belassen. Diesmal wurde jedoch bei beiden Fermentern reiner Sauerstoff zugemischt, um auch beim Vergleichsfermenter zu hohe Belüftungsraten zu vermeiden und die Gefahr des Überschäumens zu verringern. Die erforderlichen Luftmengen betrugen bei beiden Fermentern ca. 0,3 vvm, zusätzlich beim Fermenter mit DO = 50 % ca. 50 l Sauerstoff pro Stunde, beim Vergleichsfermenter zwischen 20 und 45 l Sauerstoff pro Stunde.

Auch bei diesem Versuch gab es keine Verbesserung der Hydroxylierung bei erhöhtem Sauerstoffgehalt im Nährmedium. Trockengewicht und MDg-Spiegel waren beide etwas niedriger als beim Vergleichsfermenter: nach 16 Tagen Fermentationsdauer betrug die Ausbeute an MDg beim Fermenter mit erhöhtem Sauerstoffgehalt 336,5 mg/l, beim Vergleichsfermenter jedoch 365,6 mg/l (Tabelle 16). Die Erhöhung des DO brachte also eine leichte Verschlechterung der Hydroxylierungsleistung bei diesem Zellstamm.

Tabelle 16: Fermentation mit Erhöhung des DO

| DO | konst. 30 % | 30 % / 50 % |
|---|---|---|
| Belüftungsrate (Sauerstoff) | 0,015-0,101vvm | 0,023-0,120vvm |
| Zellstamm | 287-DRB-A1/10 | 287-DRB-A1/10 |
| Fermentationsdauer | 16 Tage | 16 Tage |
| pH-Verlauf | 4,4 - 5,6 | 4,5 - 5,5 |
| Animpfmenge als TG | 1,9 g/l | 1,7 g/l |
| TG nach 16 Tagen | 23,7 g/l | 21,8 g/l |
| PCV nach 16 Tagen | 86,0 % | 86,0 % |
| Gesamt-Glucose-Verbrauch | 61,4 g/l | 59,5 g/l |
| Glucose-Verbrauch pro g TG | 2,6 g | 2,7 g |
| MDg nach 13 Inkubationstagen | 365,6 mg/l | 336,5 mg/l |
| Durchschnittl. MDt-Spiegel im Nährmedium | ca. 40 mg/l | ca. 40 mg/l |

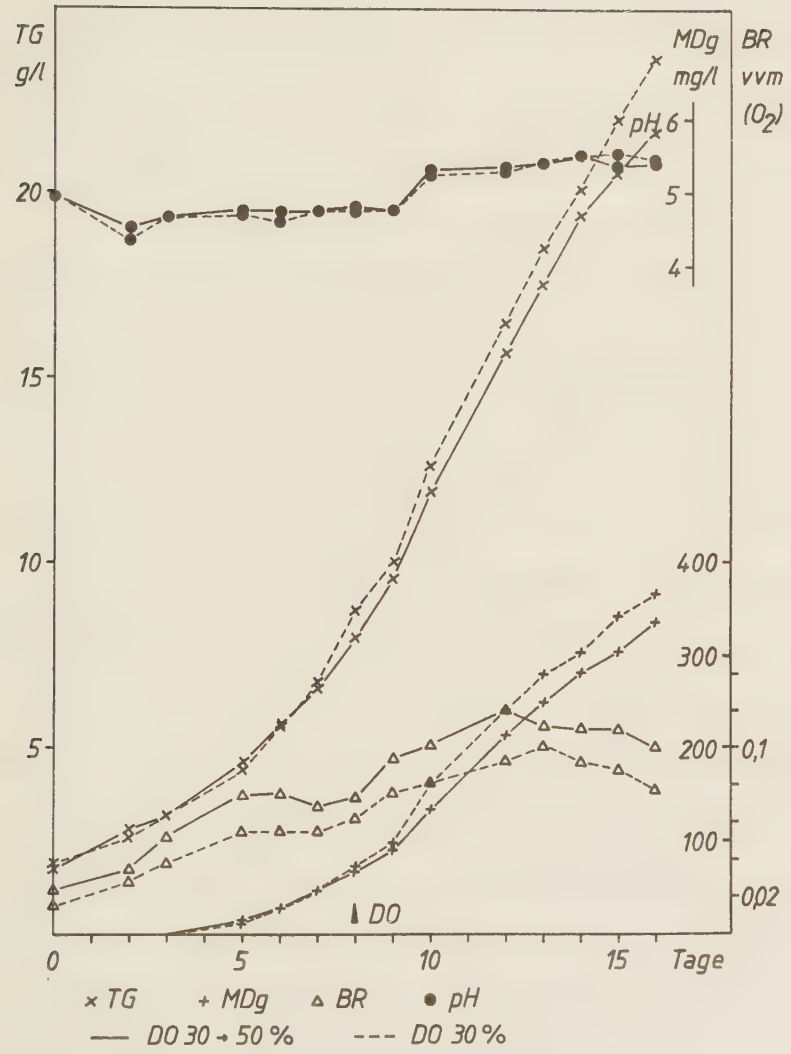



Abb. 19: Einfluß des DO auf die Hydroxylierung;
20 l-Airlift-Fermenter, Zellstamm 287-DRB-A1/10,
DO am 8. Tag von 30 auf 50 % erhöht
(Vergleichsfermenter: DO konstant 30 %)

4.4.3 Fermentation mit dem Zellstamm 10/56-S-50-Se

Der vorangegangene Versuch wurde mit dem Zellstamm 10/56-S-50-Se wiederholt, da dieser Zellstamm eine bessere Hydroxylierungsfähigkeit besaß. Die Fermentationsbedingungen der beiden Fermenter waren bis zum 6. Tag gleich, die erste MDt-Zugabe erfolgte nach zwei Tagen.

Aufgrund des etwas geringeren Sauerstoffbedarfs der Zellen wurde der Vergleichsfermenter mit einem DO von 30 % während der gesamten Dauer der Fermentation nur mit Luft belüftet. Beim zweiten Fermenter, bei dem am 6. Tag der DO auf 50 % erhöht wurde, erfolgte die Zumischung von reinem Sauerstoff ab dem 8. Tag, nachdem die Belüftungsrate 0,3 vvm Luft überschritten hatte. Es waren zusätzliche Sauerstoffmengen von 20 - 50 l Sauerstoff pro Stunde notwendig.

Bei diesem Zellstamm traten deutlichere Unterschiede bei Trockengewicht und MDg-Spiegel auf. Vor allem beim Trockengewicht zeigte der Vergeichsfermenter mit dem geringeren Sauerstoffgehalt höhere Werte. So wurden hier nach 20 Tagen 30,6 g/l erreicht, beim Fermenter mit DO = 50 % nur 23,1 g/l. Aber auch die Hydroxylierung war bei höherem Sauerstoffgehalt schlechter und blieb ständig hinter den Werten des Vergleichsfermenters zurück (Abb. 20). Die Daten zu beiden Fermentern sind in Tabelle 17 zusammengestellt. Damit konnte auch bei diesem Zellstamm keine Steigerung der Hydroxylierung von MDt zu MDg durch einen erhöhten Sauerstoffgehalt im Nährmedium erreicht werden.

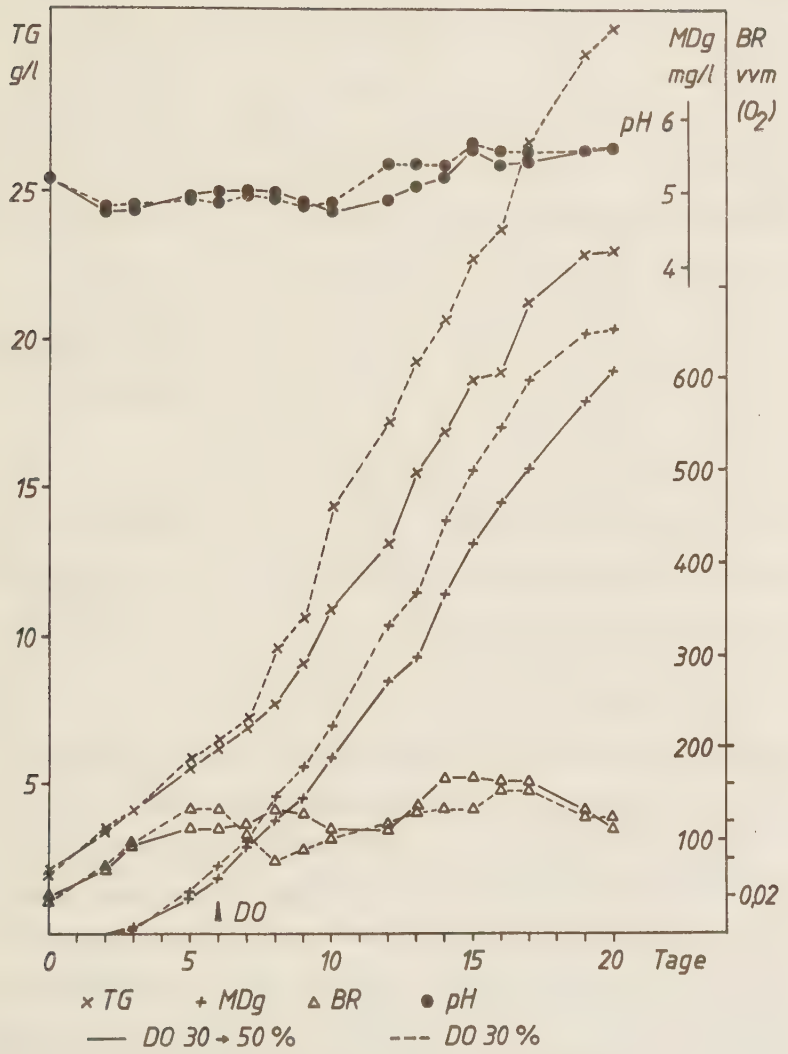



Abb. 20: Einfluß des DO auf die Hydroxylierung;
20 l-Airlift-Fermenter, Zellstamm 10/56-S-50-Se,
DO am 6. Tag von 30 auf 50 % erhöht
(Vergleichsfermenter: DO konstant 30 %)

Tabelle 17: Fermentation mit Erhöhung des DO

| DO | konst. 30 % | 30 % / 50 % |
|---|---|---|
| Belüftungsrate (Sauerstoff) | 0,016-0,076vvm | 0,020-0,083vvm |
| Zellstamm | 10/56-S-50-Se | 10/56-S-50-Se |
| Fermentationsdauer | 20 Tage | 20 Tage |
| pH-Verlauf | 4,8 - 5,6 | 4,7 - 5,6 |
| Animpfmenge als TG | 2,0 g/l | 2,1 g/l |
| TG nach 20 Tagen | 30,6 g/l | 23,1 g/l |
| PCV nach 20 Tagen | 87,0 % | 86,5 % |
| Gesamt-Glucose-Verbrauch | 79,9 g/l | 66,3 g/l |
| Glucose-Verbrauch pro g TG | 2,6 g | 2,9 g |
| MDg nach 18 Inkubationstagen | 652,9 mg/l | 606,2 mg/l |
| Durchschnittl. MDt-Spiegel im Nährmedium | ca. 40 mg/l | ca. 40 mg/l |

## 4.5 Diskussion

Nachdem gezeigt werden konnte, daß der Sauerstoffgehalt im Nährmedium Auswirkungen auf das Wachstum von Digitalis lanata-Fermenterkulturen hat (Kapitel 1), konnte dies auch für die Hydroxylierung von MDt zu MDg nachgewiesen werden. Auch hier erwies sich ein DO von 30 % als geeigneter Wert, bei dem die Hydroxylierung am besten abläuft. Ein Absenken während der Fermentation auf DO = 10 % ließ zwar das Wachstum unberührt, eine Verschlechterung der Hydroxylierung war aber deutlich zu erkennen. Bei zu starkem Absenken auf Werte unter 10 % wurde sowohl das Wachstum als auch die Hydroxylierung stark beeinträchtigt.

Eine ähnliche Auswirkung verringerter Sauerstoff-Zufuhr beobachteten auch WAGNER und VOGELMANN (1977) bei der Fermentation von Morinda citrifolia-Zellen. Bei einer Fermentation mit einer Belüftungsrate von 0,17 vvm gegenüber 0,5 vvm erhielten sie zwar die gleiche Ausbeute an Zellmasse, die Anthrachinon-Bildung betrug aber nur 40 % der Menge, verglichen mit der bei höherer Belüftung. Sie schlossen daraus, daß der Sauerstoffgehalt im Nährmedium die Anthrachinon-Bildung und das Wachstum der Zellen über verschiedene Mechanismen reguliert.

Eine Steigerung des Sauerstoffgehalts im Nährmedium erbrachte keine Verbesserung der Hydroxylierung. Hier reagierte auch nicht jeder Zellstamm gleich: während der Zellstamm 287-DRB-A1/10 je nach Fermentationsbedingungen keine bzw. nur eine sehr geringe Verschlechterung zeigte, waren die Unterschiede beim besser hydroxylierenden Zellstamm 10/56-S-50-Se bereits deutlicher zu erkennen. Bei diesem Zellstamm war auch das Trockengewicht reduziert.
Versuche, die Hydroxylierung durch erhöhte Belüftung zu steigern, wurden auch schon von HELMBOLD (1979) unternommen. Bei seinen Versuchen wurde jedoch der Sauerstoffgehalt im Nährmedium nicht gemessen. Er verglich die Hydroxylierung bei Fermentationen mit "einfacher" und "doppelter" Belüftung (350 Nl/h = ca. 0,3 vvm bzw. 700 Nl/h = ca. 0,6 vvm). Auch er beobachtete keine Verbesserung der Hydroxylierung bei stärkerer Belüftung, und die Durchführung der Fermentationen war durch mehrmaliges Überschäumen er-

schwert. Seine Fermentationen mit verringerter Animpfdichte brachten eine schlechtere Hydroxylierung bei erhöhter Belüftung.

Für eine andere Hydroxylierungsreaktion eines Steroids fanden CLARK et al. (1982) ebenfalls ein Optimum bei einem DO von 30 %. Sie untersuchten die mikrobiologische 11ß- und 19-Hydroxylierung von Reichsteins Substanz S, einer Hydrocortison-Vorstufe, und fanden für beide Reaktionen ein Optimum bei Fermentationen mit diesem DO.

## 5. Hydroxylierungsvergleich bei verschiedenen Belüftungsarten

Die Fermentationen wurden im 20 l-Airlift-Fermenter mit dem Zellstamm 10/56-S-50-Se durchgeführt. Wie schon bei den Wachstumsversuchen in Kapitel 2 wurden zwei Fermenter parallel betrieben; die Fermentationsbedingungen unterschieden sich nur in der Art der Belüftung. Ein Fermenter wurde mit konstant 0,3 vvm während der gesamten Dauer belüftet, der zweite dagegen auf einen DO von 30 % eingestellt.

### 5.1 Ergebnis der Fermentationen

Wie aus Tabelle 18 und Abb. 21 ersichtlich, wurde bei dem Fermenter mit Sauerstoff-Regelung bei einem DO von 30 % eine bessere Hydroxylierung erreicht: nach 15 Tagen wurde hier ein MDg-Gehalt von 514,1 mg/l gemessen, während der Fermenter mit konstanter Belüftungsrate nur 459,8 mg/l erreichte. Der Unterschied in der Hydroxylierungsleistung bestand jedoch nicht von Anfang an, sondern zeigte sich erst nach ca. 8 Tagen, nachdem der DO beim Fermenter mit konstanter Belüftungsrate auf Werte zwischen 10 und 20 % abgesunken war und bis zum Ende der Fermentation auf dieser Höhe blieb. Auch das Trockengewicht blieb bei diesem Fermenter etwas hinter den Werten des anderen Fermenters zurück.

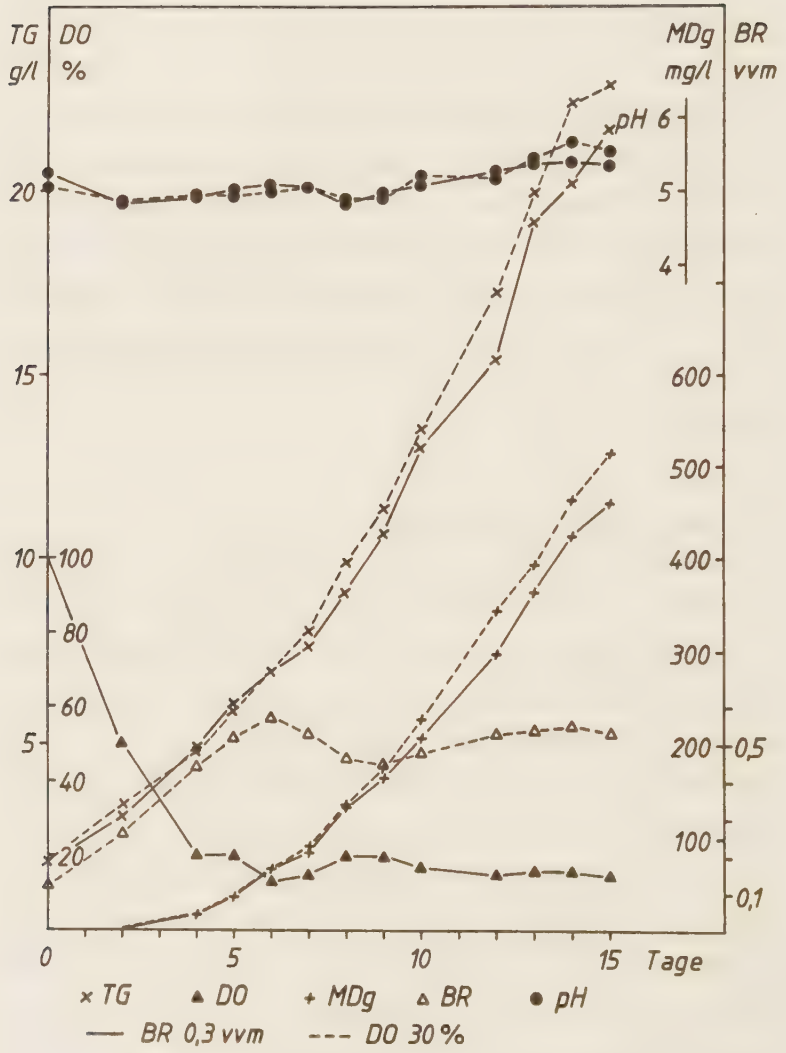



Abb. 21: Fermentation mit Zellstamm 10/56-S-50-Se; Hydroxylierungsvergleich DO = 30 % / konstante Belüftungsrate 0,3 vvm, 20 l-Airlift-Fermenter

Tabelle 18: Hydroxylierungsvergleich bei verschiedenen Belüftungsarten

| | | |
|---|---|---|
| DO | konst. 30 % | 100 % - 13 % |
| Belüftungsrate | 0,12-0,57 vvm | konst. 0,3 vvm |
| Zellstamm | 10/56-S-50-Se | 10/56-S-50-Se |
| Fermentationsdauer | 15 Tage | 15 Tage |
| pH-Verlauf | 4,9 - 5,7 | 4,8 - 5,4 |
| Animpfmenge als TG | 1,9 g/l | 1,8 g/l |
| TG nach 15 Tagen | 22,9 g/l | 21,7 g/l |
| PCV nach 15 Tagen | 83,0 % | 76,0 % |
| Gesamt-Glucose-Verbrauch | 52,3 g/l | 41,0 g/l |
| Glucose-Verbrauch pro g TG | 2,3 g | 1,9 g |
| MDg nach 13 Inkubationstagen | 514,1 mg/l | 459,8 mg/l |
| Durchschnittl. MDt-Spiegel im Nährmedium | ca. 40 mg/l | ca. 40 mg/l |

## 5.2 Diskussion

Ebenso wie bei den Versuchen in Kapitel 4 zeigte sich auch hier eine Abhängigkeit der Hydroxylierungsleistung vom Sauerstoffgehalt im Nährmedium. Da jedoch die Unterschiede im Sauerstoffgehalt nur zwischen 10 und 15 % Sauerstoffsättigung betrugen, traten auch die Unterschiede in der Hydroxylierung nicht so deutlich hervor.

Die Methode der Sauerstoff-Regelung hatte sich also auch bei Fermentationen mit Substratzugabe als vorteilhafter erwiesen: zum einen wurden bessere Ergebnisse erzielt, zum anderen ist damit auch eine bessere Konstanz der Fermenta-

tionsbedingungen möglich.

Vor allem im Hinblick auf ein Scale-up bietet die Regelung der Luftzufuhr mit definiertem Sauerstoffgehalt im Nährmedium gleiche Verhältnisse für verschiedene Fermentergrößen. Zwar lassen sich auch konstante Belüftungsraten beim Scale-up angleichen, der Sauerstoffgehalt im Nährmedium kann aber dennoch unterschiedlich sein und somit ungleiche Fermentationsbedingungen schaffen.

## 6. Hydroxylierungsvergleich mit verschiedenen Fermentern

Diese Fermentationen wurden mit dem Zellstamm 287 durchgeführt, da zum Zeitpunkt der Versuche die besser hydroxylierenden Zellstämme 287-DRB-A1/10 bzw. 10/56-S-50-Se noch nicht zur Verfügung standen. Verglichen wurden wie schon beim Wachstumsversuch in Kapitel 3.1 der Biostat U30D-Fermenter, umgerüstet auf Airlift-Betrieb, mit dem 20 l-Airlift-Fermenter. Um gleiche Bedingungen zu schaffen, wie sie auch beim Wachstumsvergleich herrschten, wurde eine konstante Belüftungsrate von 0,3 vvm gewählt.

### 6.1 Ergebnis und Diskussion der Fermentationen

Da die Animpfdichte mit einem Trockengewicht von 1,4 g/l sowohl beim 20 l-Airlift-Fermenter als auch beim Biostat U30D relativ gering war, konnte die erste MDt-Zugabe wegen des langsamen Wachstums erst nach 7 Tagen erfolgen. Dies beeinträchtigte das Wachstum der Zellen im 20 l-Airlift-Fermenter nur wenig, während es im Biostat U30D zu einer stärkeren Hemmung führte, von der sich die Zellen erst nach 3 Tagen erholten (Abb. 22). Aber auch danach war das Wachstum in diesem Fermenter, verglichen mit dem 20 l-Airlift-Fermenter, relativ gering. Nach 23 Tagen wurde nur ein Trockengewicht von 8,2 g/l erreicht, während beim 20 l-Airlift-Fermenter mit 15,4 g/l fast das doppelte Trockengewicht gemessen werden konnte (Tabelle 19).

Der MDg-Gehalt war absolut gesehen beim Biostat U30D zwar niedriger, bezieht man die Hydroxylierungsleistung jedoch

auf die gebildete Zellmasse, so zeigt sich, daß hier mit 20,2 mg MDg/g TG wesentlich mehr MDt zu MDg hydroxyliert wurde als im 20 l-Airlift-Fermenter (14,8 mg MDg/g TG).
Eine Erklärung hierfür bietet der Sauerstoffgehalt im Nährmedium: durch das bessere Wachstum der Zellen im 20 l-Airlift-Fermenter sank hier der DO schneller und weiter ab und lag ab dem 10. Tag ständig unter 20 %, vom 15. - 21. Tag sogar unter 5 % - Bedingungen, die bei den Versuchen in Kapitel 4 zu einer schlechteren Hydroxylierung führten. Beim Biostat U30D hingegen betrug der tiefste Wert 33 % und blieb für die Zeit der MDt-Inkubation meist zwischen 40 und 50 %. Durch den höheren Sauerstoffgehalt erhält man auch hier eine verbesserte Hydroxylierungsleistung.
Für eine wirtschaftliche Nutzung dieses Prozesses ist jedoch ein hoher MDg-Gehalt erwünscht und somit einem Fermenter der Vorzug zu geben, in dem dies eher möglich ist. Ein weiterer Nachteil des Biostat U30D-Fermenters zeigte sich bei dieser Fermentation wiederum in einem starken Randbewuchs oberhalb des Flüssigkeitsspiegels, der das zugegebene MDt anreicherte und damit der Hydroxylierung durch die Zellsuspension entzog. Dies ist ebenfalls nicht im Sinne einer wirtschaftlichen Ausnutzung des eingesetzten Substrats.

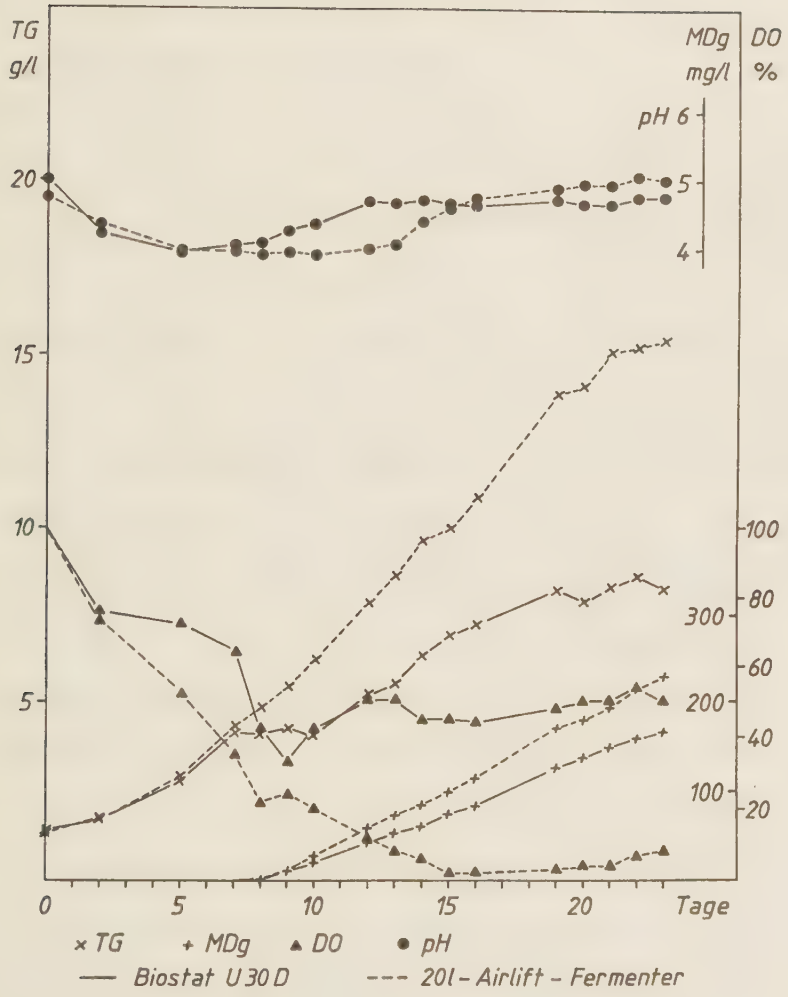



Abb. 22: Fermentation mit Zellstamm 287;
Hydroxylierungsvergleich 20 l-Airlift-Fermenter / Biostat U30D, Belüftungsrate konstant 0,3 vvm

Tabelle 19: Hydroxylierungsvergleich mit verschiedenen Fermentern

| Fermenter | 20 l-Airlift | Biostat U30D |
|---|---|---|
| Zellstamm | 287 | 287 |
| Fermentationsdauer | 23 Tage | 23 Tage |
| pH-Verlauf | 3,9 - 5,1 | 3,9 - 4,8 |
| Animpfmenge als TG | 1,4 g/l | 1,4 g/l |
| TG nach 23 Tagen | 15,4 g/l | 8,2 g/l |
| PCV nach 23 Tagen | 55,5 % | 30,0 % |
| Gesamt-Glucose-Verbrauch | 48,7 g/l | 31,8 g/l |
| Glucose-Verbrauch pro g TG | 3,2 g | 3,9 g |
| Belüftungsrate | konst. 0,3 vvm | konst. 0,3 vvm |
| DO | 100 % - 2 % | 100 % - 33 % |
| MDg nach 16 Inkubationstagen | 228,8 mg/l | 166,6 mg/l |
| Durchschnittl. MDt-Spiegel im Nährmedium | ca. 40 mg/l | ca. 40 mg/l |

## 7. Vergleich von verschiedenen Fermentern und Rührsystemen durch $k_La$-Messungen

Die Absicht der hier durchgeführten Messungen war es, für die am Institut vorhandenen Fermentertypen eine Vergleichsmöglichkeit zu finden. Dabei war die Versorgung des Nährmediums mit Sauerstoff bei der Begasung mit Luft von besonderem Interesse. Zwar lassen sich Fermenter auch durch Messung der Mischzeiten nach Säure- bzw. Laugenzugabe (EINSELE 1976) oder durch Leitfähigkeitsmessungen nach Elektrolytzugabe (ROUSSEAU und BU'LOCK 1980) charakterisieren, die Sauerstoffverhältnisse im Nährmedium bleiben bei diesen Methoden aber unberücksichtigt. Lediglich die durch die Luftzufuhr bzw. Rührung verursachte Durchmischung des Nährmediums wird erfaßt. Die Kenntnis dieser Durchmischung ist vor allem bei mikrobiologischen Prozessen von Bedeutung, wenn die Substratzugabe die Reaktionsgeschwindigkeit der gewünschten Reaktion bestimmt oder bei kontinuierlichen Kulturen die Wachstumskinetik beeinflußt. Für solche Fermentationen ist eine rasche und gleichmäßige Substratverteilung erwünscht. Für die Hydroxylierung von MDt zu MDg ist dies jedoch zweitrangig, da ohnehin mit einem ständigen Substratüberschuß gearbeitet wird. Es ist hier wichtiger, die Auswirkungen der Belüftung und Rührung auf die Sauerstoffversorgung des Nährmediums zu kennen. Diese Information erhält man durch Messung der $k_La$-Werte.

Der Sauerstoffübergangskoeffizient $k_La$ ist ein Maß für den Übergang des durch die Belüftung eingetragenen Sauerstoffs von der gasförmigen in die flüssige Phase (Nährmedium). Bei definierten Bedingungen von Belüftung und Rührung ist er eine Art Kennzahl für einen Fermenter, und je höher der $k_La$-Wert ist, um so besser erfolgt der Sauerstoffübergang. Die theoretischen Grundlagen dieses Sauerstoffübergangs sind von mehreren Autoren eingehend beschrieben (LEE und TSAO 1979, HENZLER 1980, SINCLAIR 1984).

Die in der Literatur angegebenen $k_La$-Werte lassen sich durch die unterschiedlichen Meßmethoden nur schwer untereinander vergleichen, und jede Methode ist mit ihren eigenen Fehlern und Nachteilen behaftet (DUNN und EINSELE 1975, HASENBÖHLER 1978). Aus diesem Grund sind die bei den hier durchgeführten Messungen erhaltenen Werte nur bedingt für einen Vergleich mit $k_La$-Werten anderer Meßmethoden oder anderer Fermenter vergleichbar. Sie sind aber für einen Vergleich der vorhandenen Fermenter untereinander geeignet, da die Ergebnisse alle auf der gleichen Meßmethode beruhen.

## 7.1 $k_La$-Messungen bei Airlift-Fermentern

Die Messungen wurden bei vier verschiedenen Airlift-Fermentern mit Belüftungsraten von 0,1 - 0,6 vvm durchgeführt. Beim 20 l-Airlift-Fermenter und beim 250 l-Airlift-Fermenter handelt es sich um reine Airlift-Fermenter, während beim Biostat U30D und beim 300 l-Fermenter auch der Einsatz von Rührern möglich ist. Die beiden letzten Fermenter entsprechen in ihren äußeren Abmessungen der DECHEMA-

Betreibernorm für Bioreaktoren (DECHEMA 1982), unterscheiden sich aber in der Umwälzung der Zellsuspension. Beim 300 l-Fermenter ist der Durchmesser $d_r$ der ringförmigen Luftdüse größer als der Durchmesser d des inneren Leitrohrs (Abb. 2), somit erfolgt die Umwälzung der Zellsuspension von außen nach innen, d. h. die Zellen steigen im äußeren Bereich des Fermenters hoch und strömen innen im Leitrohr nach unten. Bei den anderen drei Fermentern erfolgt die Umwälzung in umgekehrter Richtung.

Eine Besonderheit hat auch der 250 l-Airlift-Fermenter aufzuweisen: anstelle einer ringförmigen Luftdüse mit ca. 15 - 20 Öffnungen besitzt dieser Fermenter eine Siebplatte mit 92 Löchern, so daß die Luft hier feiner verteilt wird, da sie aus wesentlich mehr Öffnungen ausströmt. Dies bestätigt sich bei den in Tabelle 20 aufgeführten $k_La$-Werten: während die $k_La$-Werte der übrigen drei Fermenter bei den jeweiligen Belüftungsraten nur geringe Unterschiede aufweisen, erreicht der 250 l-Airlift-Fermenter etwa doppelt so hohe Werte.

Abb. 23 zeigt die graphische Darstellung der erhaltenen Meßwerte.

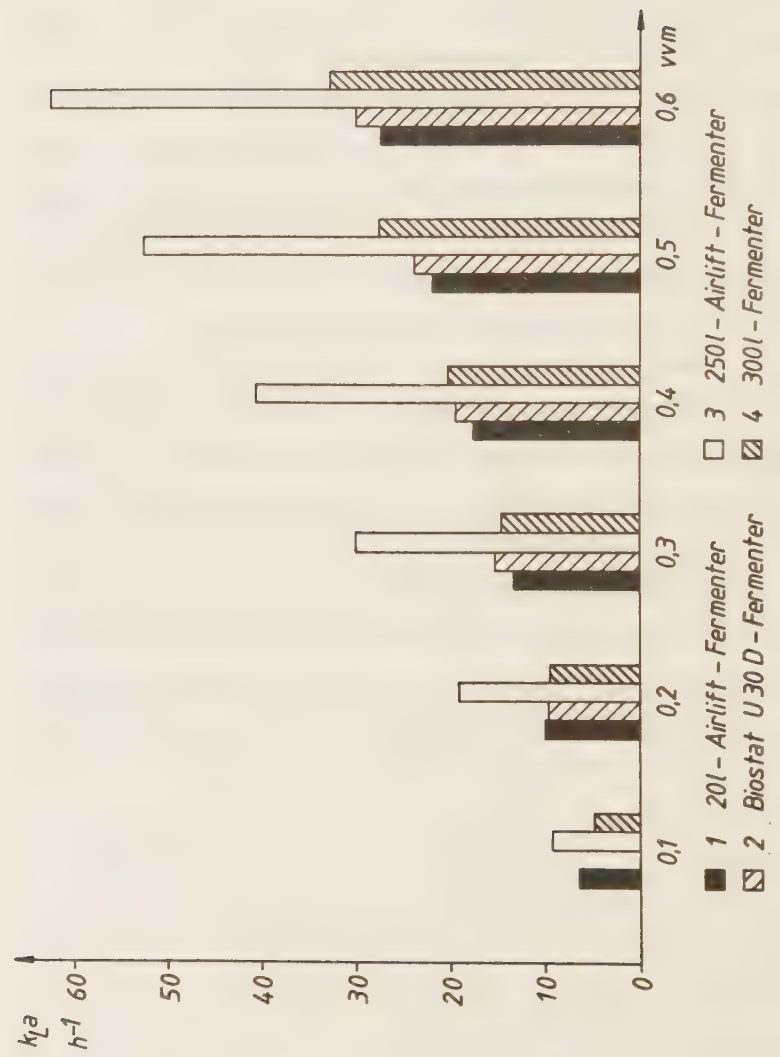



Abb. 23: $k_La$-Werte der Airlift-Fermenter

Tabelle 20: $k_La$-Werte der Airlift-Fermenter ($h^{-1}$)

| Fermenter | Belüftungsrate (vvm) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,5 | 0,6 |
| 20 l-Airlift-Fermenter | 6,3 | 9,9 | 13,3 | 17,6 | 21,8 | 27,4 |
| Biostat U30D | * | 9,7 | 15,3 | 19,4 | 23,8 | 30,1 |
| 250 l-Airlift-Fermenter | 9,2 | 19,0 | 30,0 | 40,6 | 52,5 | 62,5 |
| 300 l-Fermenter | 4,7 | 9,5 | 14,5 | 20,3 | 27,6 | 32,7 |

* erforderliche Luftmenge nicht einstellbar

## 7.2 $k_La$-Messungen im Biostat U30D-Fermenter mit verschiedenen Rührsystemen

Die in Abb. 3 dargestellten Rührer wurden mit 50, 100 und 200 upm betrieben, die Belüftungsraten betrugen hierbei 0,2 - 0,6 vvm.

Bei Rührer B mit zusätzlichem Schikanenkorb handelt es sich um den zur Standard-Ausrüstung des Fermenters gehörenden Rührer, wie er für mikrobiologische Fermentationen gebräuchlich ist.

Der Spin-Rührer C ist so konstruiert, daß die vier senkrechten Rotorblätter beweglich gelagert sind und sich bei Betrieb um ihre eigene Achse drehen können.

Der Wendel-Rührer D wurde so eingebaut, daß die Wendel bei Rotation eine Aufwärtsbewegung ausführte.

Die erhaltenen Meßwerte sind in Tabelle 21 aufgeführt, Abb. 24 zeigt die graphische Darstellung.

Tabelle 21: $k_La$-Werte der verschiedenen Rührsysteme ($h^{-1}$)

| Rührer | upm | Belüftungsrate (vvm) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,5 | 0,6 |
| | 50 | 11,6 | 15,9 | 19,2 | 23,2 | 28,2 |
| A | 100 | 14,5 | 18,8 | 21,9 | 26,2 | 30,5 |
| | 200 | 20,6 | 26,8 | 32,0 | 35,4 | 36,0 |
| | 50 | 11,2 | 17,3 | 21,3 | 26,2 | 30,7 |
| B | 100 | 16,7 | 23,2 | 28,2 | 33,3 | 36,5 |
| | 200 | 38,7 | 52,8 | 60,9 | 76,2 | 89,1 |
| | 50 | 10,6 | 14,5 | 16,2 | 17,4 | 18,3 |
| C | 100 | 12,1 | 15,4 | 18,6 | 20,0 | 21,5 |
| | 200 | 23,6 | 29,0 | 32,4 | 34,9 | 37,4 |
| | 50 | 8,3 | 14,2 | 18,1 | 20,8 | 24,2 |
| D | 100 | 7,6 | 13,9 | 20,1 | 22,9 | 26,2 |
| | 200 | 10,4 | 16,0 | 18,6 | 21,1 | 26,0 |
| * | - | 9,7 | 15,3 | 19,4 | 23,8 | 30,1 |

A Propeller-Rührer mit 2 Rührsternen

B Blatt-Rührer mit 3 Rührsternen und Schikanenkorb

C Spin-Rührer (Chemap AG, Männedorf/Schweiz)

D Wendel-Rührer (Nattermann, Köln)

* zum Vergleich: Werte bei Airlift-Betrieb

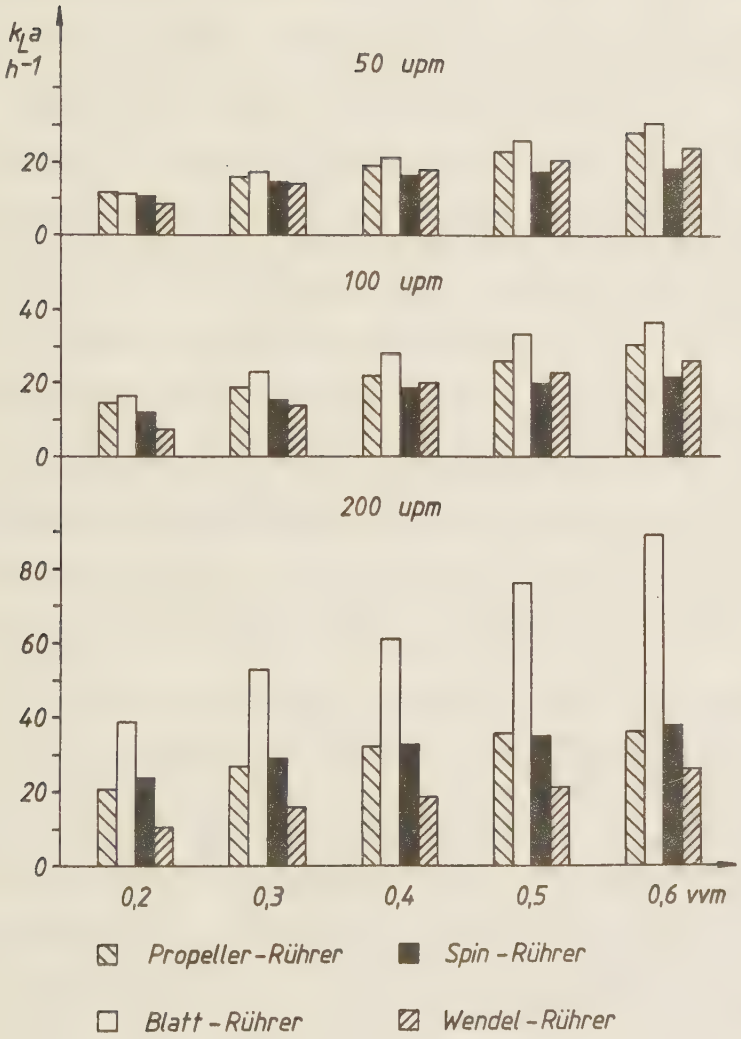



Abb. 24: $k_La$-Werte der verschiedenen Rührsysteme

7.3 Diskussion

Bei der Fermentation von pflanzlichen Zellkulturen in Airlift-Fermentern ist man an einem effektiv arbeitenden Belüftungssystem des Fermenters interessiert. Die Luftmenge soll aus wirtschaftlichen Gründen möglichst klein bleiben, andererseits hängt auch die Umwälzung der Zellsuspension von der Belüftung ab. Den Belüftungsraten sind daher nach oben und unten Grenzen gesetzt, deren Überschreitung sich nachteilig auf die Zellkultur auswirkt.

Die Folgen unterschiedlicher Belüftungssysteme zeigten sich in Tabelle 20: trotz gleicher Belüftungsraten bestanden erhebliche Unterschiede in der Ausnutzung der eingeblasenen Luft. Beim 250 l-Airlift-Fermenter ist sie besonders effektiv, da auch schon bei geringen Belüftungsraten ein guter Übergang des Sauerstoffs ins Nährmedium erfolgt. Gerade bei pflanzlichen Zellkulturen ist dies von besonderem Interesse, da mit niedrigen Belüftungsraten auch eine schonende Umwälzung der Zellsuspension verbunden ist und die Belastung der Zellen durch Scherkräfte gering bleibt.

Bei mehreren Fermentationen, vor allem bei Fermentationen mit MDt-Zugabe, war immer wieder eine starke Schaumbildung zu beobachten, nicht zuletzt hervorgerufen durch hohe Belüftungsraten. Hier wäre es wünschenswert, wenn man durch ein wirksameres Belüftungssystem mit geringeren Belüftungsraten auskommen würde.

Betrachtet man die Ergebnisse der verschiedenen Rührsysteme in Tabelle 21, so fallen die hohen Meßwerte des Rührers B

bei 200 upm auf. Dieses Rührsystem, üblicherweise für mikrobiologische Prozesse eingesetzt, entfaltet seine Wirksamkeit vor allem bei Bedingungen, wie sie für pflanzliche Zellkulturen im allgemeinen nicht mehr zuträglich sind. KATO et al. (1975) konnten an Nicotiana tabacum-Zellen zeigen, daß Drehzahlen von 150 und 200 upm die Ausbeute an Zellmasse gegenüber 50 und 100 upm verringerten. Auch SCHMAUDER und KOBLITZ (1980) berichten in ihrem Übersichtsartikel, daß Werte von 50 - 150 upm als günstige Rührgeschwindigkeiten beschrieben wurden.
Die Messungen bei 200 upm wurden durchgeführt, um die Auswirkungen einer starken Erhöhung der Drehzahl zu untersuchen. Dabei zeigte sich auch, daß damit nicht immer eine Verbesserung des Sauerstoffübergangs verbunden sein muß. Beim Wendel-Rührer D ergaben sich bei Belüftungsraten ab 0,4 vvm sogar leichte Verschlechterungen der $k_La$-Werte.

Bei allen Rührern hat sich ergeben, daß für einen besseren Sauerstoffübergang eine Erhöhung der Belüftungsrate wirksamer ist als eine Steigerung der Drehzahl. Manche Fermentationsanlagen haben die Möglichkeit, den Gehalt an gelöstem Sauerstoff im Nährmedium sowohl über eine Veränderung der Belüftungsrate als auch über eine Veränderung der Drehzahl zu regulieren. Bei der Fermentation von pflanzlichen Zellkulturen sollte diese Regelung nur über die Belüftungsrate erfolgen, da dies wirksamer und für die Zellen schonender ist.

$k_La$-Werte ermöglichen im Zusammenhang mit dem Sauerstoffverbrauch der Zellkultur eine Aussage darüber, ob bei den jeweiligen Fermentationsbedingungen eine ausreichende Sauerstoff-Versorgung gewährleistet ist.

Umgekehrt ist es möglich, den minimalen $k_La$-Wert zu berechnen, der notwendig ist, damit bei der Fermentation keine Limitierung des Wachstums durch Sauerstoff eintritt. Über den Zusammenhang zwischen $k_La$-Wert und Belüftungsrate bzw. Rührer-Drehzahl lassen sich so die geeigneten Fermentationsbedingungen ermitteln. Berechnungen dieser Art wurden von KATO et al. (1975) und von CHAUBET (1981) beschrieben. KATO et al. konnten auch einen linearen Zusammenhang zwischen der Ausbeute an Zellmasse und dem $k_La$-Wert zeigen, wenn unter Bedingungen mit Sauerstoff-Limitierung fermentiert wird ($k_La$-Werte bis 10 $h^{-1}$).

Bei der Berechnung der minimalen $k_La$-Werte zur Vermeidung einer Limitierung des Wachstums durch Sauerstoff muß aber berücksichtigt werden, daß diese $k_La$-Werte für Bedingungen gelten, wie sie nur vor Fermentationsbeginn herrschen. Während der Fermentation verändert sich ständig die Zusammensetzung des Nährmediums und durch die Zunahme an Zellmasse auch die Viskosität der Flüssigkeit im Fermenter. Gerade die Zunahme der Viskosität wirkt sich nachteilig auf den Sauerstoffübergang aus, und der $k_La$-Wert verringert sich während der Fermentation ständig, wenn bei konstanten Belüftungsraten bzw. Drehzahlen fermentiert wird (TANAKA 1981 und 1982, TANAKA et al. 1983). Aus diesem Grund empfiehlt es sich, bei der Festlegung der Belüftungsrate mit

einem Überschuß zu arbeiten oder durch Regelung der Luftzufuhr eine ausreichende Sauerstoff-Versorgung sicherzustellen.

Ebenfalls wichtig ist die Kenntnis der $k_La$-Werte für ein erfolgreiches Scale-up von Fermentationen (RICHARDS 1961, BANDYOPADHYAY et al. 1967). Will man die Fermentationsbedingungen eines Fermenters im Labormaßstab auf größere Fermentationsanlagen übertragen, so ist bei gleichen $k_La$-Werten der beiden Fermenter auch eine entsprechende Sauerstoff-Versorgung möglich - eine wichtige Voraussetzung zur Erzielung gleicher Ergebnisse.

## 8. Fermentation mit MDt-Zugabe im Biostat U30D-Fermenter mit Rührer-Betrieb

Versuche, die Hydroxylierung von MDt zu MDg im Fermenter mit Rührer-Betrieb durchzuführen, wurden auch schon von WAHL (1977) unternommen; dabei wurde MDg nur in Spuren gebildet. Da aber die verwendete Zellkultur auch bei Hydroxylierungsversuchen in Erlenmeyerkolben nur geringe Umwandlungsraten aufwies, blieb ungeklärt, ob die Ursache für die schlechte Hydroxylierung bei der Zellkultur oder bei den Fermentationsbedingungen lag. Für alle folgenden Fermentationen mit MDt-Zugabe wurden aber seither nur Airlift-Fermenter verwendet.

Mit dem Biostat U30D stand ein Fermenter zur Verfügung, der es ohne größeren technischen Aufwand erlaubte, verschiedene Rührsysteme einzubauen. Die Frage der Hydroxylierung von MDt zu MDg im Fermenter mit Rührer-Betrieb sollte daher mit diesem Fermenter erneut untersucht werden.

Die Fermentationen wurden mit dem Zellstamm 10/56-S-50-Se durchgeführt, der zum Zeitpunkt der Fermentationen eine gute Hydroxylierungsfähigkeit aufwies. Zum Einsatz kamen der Wendel-Rührer und der Spin-Rührer, jeweils mit einer Drehzahl von 100 upm. Der Blatt-Rührer mit Schikanenkorb wurde nicht verwendet. Er zeigte zwar bessere $k_La$-Werte bei den vorangegangenen Messungen, aber schon WAHL (1977) konnte nachweisen, daß Prallbleche, wie sie beim Schikanenkorb vorhanden waren, das Wachstum einer Duboisia myoporoides-Zellkultur stark beeinträchtigten. Die Fermentations-

bedingungen waren bei beiden Versuchen gleich: Arbeitsvolumen 27 l, DO konstant 30 % während der gesamten Fermentationsdauer, und das Inoculum bestand bei beiden Fermentationen aus der 7 Tage alten Vorkultur von 14 Erlenmeyerkolben mit je 300 ml Zellsuspension.

8.1 Fermentation mit dem Wendel-Rührer

Die Zellkultur zeigte ein gutes Wachstum, darum konnte die erste MDt-Zugabe bereits nach dem 2. Tag bei einem Sedimentationsvolumen von 16 % erfolgen. Das Wachstum wurde von den MDt-Zugaben nur wenig beeinträchtigt, und das Trockengewicht erreichte nach 23 Tagen einen Wert von 27,1 g/l. Der MDg-Spiegel nahm rasch zu: am Ende der Fermentation (nach 21 Inkubationstagen) war ein MDg-Gehalt von 818,2 mg/l erreicht (Tabelle 22). Dieser hohe MDg-Spiegel war bei den vorangegangenen Fermentationen in Airlift-Fermentern nicht erreicht worden.

Die Schaumbildung war nicht so stark wie bei den Fermentationen in Airlift-Fermentern, erst nach 20 Tagen war ein leichtes Überschäumen zu beobachten. Durch Zugabe von Antischaummittel konnte weiteres Überschäumen vermieden werden. Der Verlauf der Fermentation ist in Abb. 25 dargestellt.

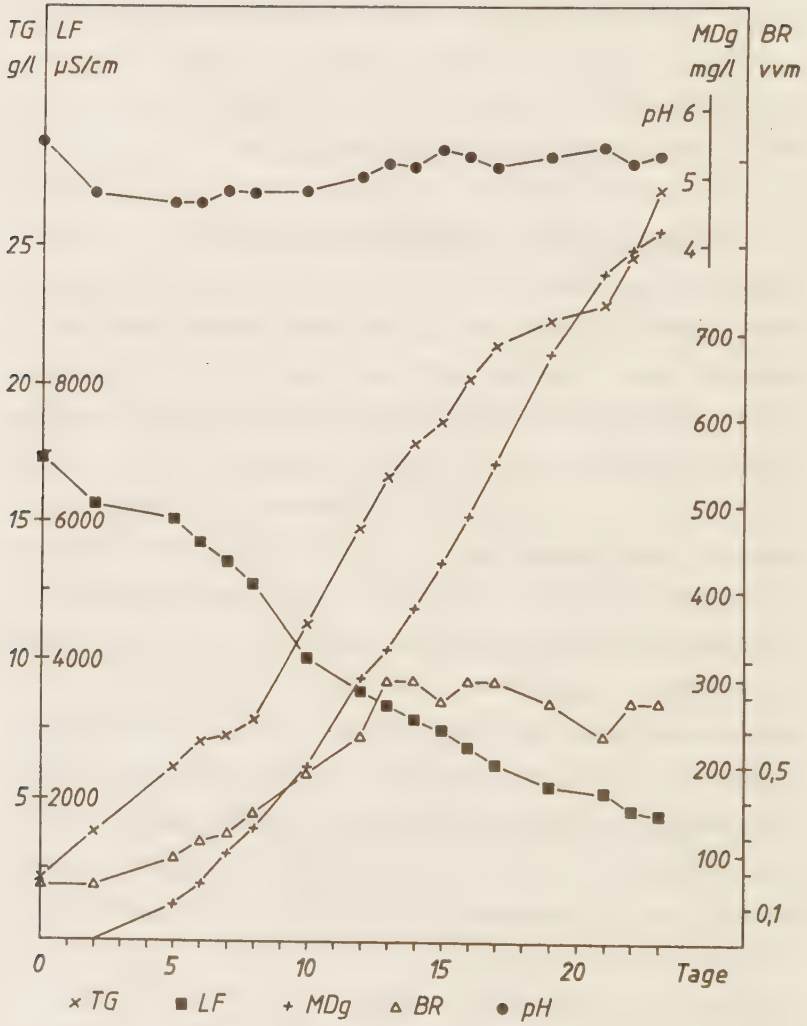



Abb. 25: Fermentation mit MDt-Zugabe im Biostat U30D-Fermenter mit Wendel-Rührer;
Zellstamm 10/56-S-50-Se, DO konst. 30 %, 100 upm

Tabelle 22: Fermentation im Biostat U30D mit Wendel-Rührer

| | |
|---|---|
| Zellstamm | 10/56-S-50-Se |
| Fermentationsdauer | 23 Tage |
| pH-Verlauf | 4,6 - 5,5 |
| Animpfmenge als TG | 2,1 g/l |
| TG nach 22 Tagen (23 Tage: 27,1 g/l) | 24,7 g/l |
| PCV nach 22 Tagen (23 Tage: 89,0 %) | 87,0 % |
| Gesamt-Glucose-Verbrauch | 84,3 g/l |
| Glucose-Verbrauch pro g TG | 3,1 g |
| Belüftungsrate | 0,15 - 0,74 vvm |
| DO | konstant 30 % |
| MDg nach 22 Tagen (23 Tage: 818,2 mg/l) | 795,8 mg/l |
| Durchschnittlicher MDt-Spiegel im Nährmedium | ca. 40 mg/l |

## 8.2 Fermentation mit dem Spin-Rührer

Wie schon bei der Fermentation mit Wendel-Rührer konnte auch hier die erste MDt-Zugabe nach dem 2. Tag erfolgen. Das Wachstumsverhalten der Zellkultur war ebenfalls normal, und die Hydroxylierung verlief noch etwas schneller als bei Betrieb mit Wendel-Rührer (Abb. 26). Bereits nach 21 Tagen war ein MDg-Spiegel von über 800 mg/l erreicht, der dann aber auch nicht mehr weiter anstieg und am 22. Tag einen Endwert von 806,1 mg/l hatte (Tabelle 23). Das Trockengewicht war mit 27,3 g/l nur unwesentlich höher als bei der Fermentation mit Wendel-Rührer. Ein Überschäumen wurde während der gesamten Fermentationsdauer nicht beobachtet.

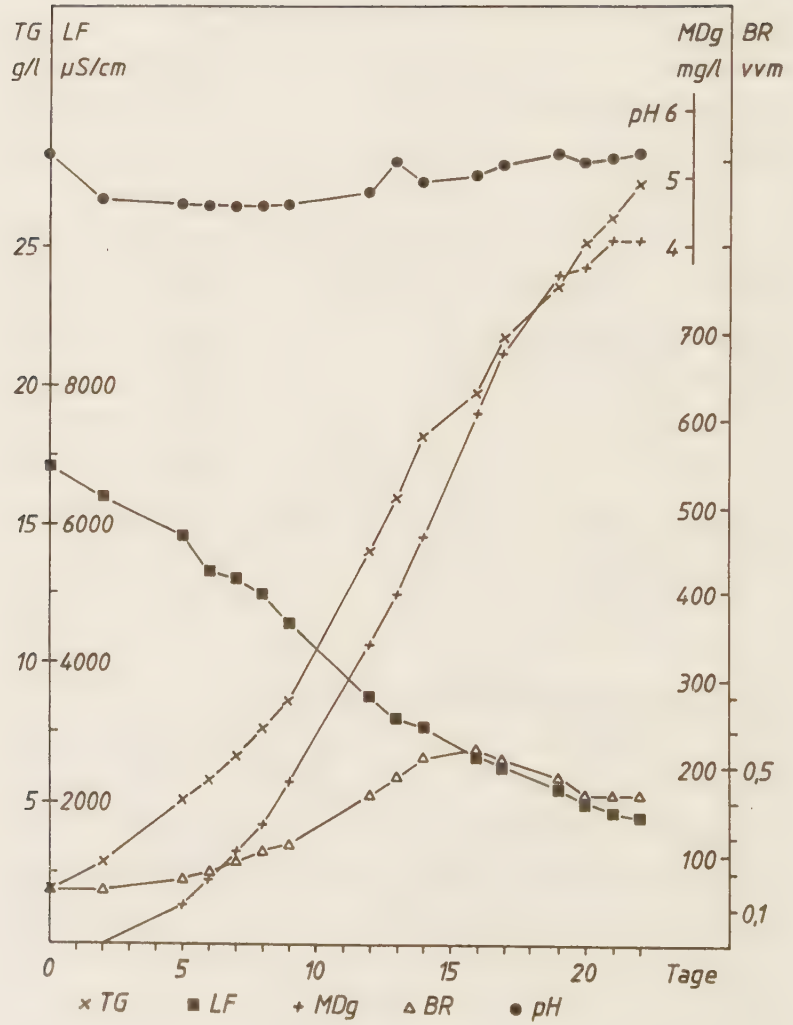



Abb. 26: Fermentation mit MDt-Zugabe im Biostat U30D-Fermenter mit Spin-Rührer;
Zellstamm 10/56-S-50-Se, DO konst. 30 %, 100 upm

Tabelle 23: Fermentation im Biostat U30D mit Spin-Rührer

| | |
|---|---|
| Zellstamm | 10/56-S-50-Se |
| Fermentationsdauer | 22 Tage |
| pH-Verlauf | 4,6 - 5,4 |
| Animpfmenge als TG | 1,9 g/l |
| TG nach 22 Tagen | 27,3 g/l |
| PCV nach 22 Tagen | 83,0 % |
| Gesamt-Glucose-Verbrauch | 82,3 g/l |
| Glucose-Verbrauch pro g TG | 3,0 g |
| Belüftungsrate | 0,15 - 0,55 vvm |
| DO | konstant 30 % |
| MDg nach 22 Tagen | 806,1 mg/l |
| Durchschnittlicher MDt-Spiegel im Nährmedium | ca. 40 mg/l |

## 8.3 Diskussion

Mit beiden Rührern wurden bei der Hydroxylierung von MDt zu MDg bessere Ergebnisse erzielt als bei der Fermentation in Airlift-Fermentern.

Zum Vergleich:

| | |
|---|---|
| 20 l-Airlift-Fermenter nach 20 Tagen (Kap. 4.4.3) (Ende der Fermentation) | 653 mg/l |
| Biostat U30D mit Wendel-Rührer nach 20 Tagen | 720 mg/l |
| Biostat U30D mit Spin-Rührer nach 20 Tagen | 776 mg/l |

Der Grund dürfte darin liegen, daß gegen Ende der Fermentation, wenn hohe Zelldichten erreicht sind, die Durchmischung und Sauerstoff-Versorgung der Zellkultur bei

Rührer-Betrieb verbessert ist und die Zellen länger am Leben erhalten werden können. Bei den Airlift-Fermentern konnte am Ende der Fermentationen mehrfach beobachtet werden, daß trotz hoher Belüftungsraten die Umwälzung nur sehr langsam erfolgte, teilweise kam es sogar zu einer Sedimentation der Zellen. Auch WILSON (1978) berichtet, daß bei Zelldichten mit einem Trockengewicht von über 20 g/l die Umwälzung in Airlift-Fermentern behindert ist und sich Zonen ausbilden, in denen die Zellen nicht bewegt werden. TANAKA (1981) machte bei seinen Versuchen mit Airlift- und gerührten Fermentern die gleichen Beobachtungen und kommt zu dem Ergebnis, daß der Airlift-Fermenter für hohe Zelldichten nicht geeignet ist. Durch die guten Ergebnisse bei der Hydroxylierung von MDt zu MDg im gerührten Fermenter konnte auch der Nachweis erbracht werden, daß für Biotransformationen durch pflanzliche Zellkulturen nicht immer Airlift-Fermentern der Vorzug zu geben ist. Zwar empfehlen WAGNER und VOGELMANN (1977) den Airlift-Fermenter für Fermentationen mit pflanzlichen Zellkulturen, vor allem im Hinblick auf eine Gewinnung von Sekundärstoffwechsel-Produk-ten, im Einzelfall können sich aber Rühr-Fermenter als günstiger erweisen, besonders dann, wenn hohe Zelldichten erreicht werden.

## D Zusammenfassung der Ergebnisse

Der Digitalis lanata-Zellstamm R 287 T wurde bei verschiedenen Gehalten an gelöstem Sauerstoff im Nährmedium im 20 l-Airlift-Fermenter kultiviert. Dabei ergab sich für das Wachstum ein Optimum bei einem Gehalt von DO = 30 %. Dies ist bei der Vorzucht für Großfermenter von Bedeutung, da hier ein schnelles Wachstum erwünscht ist.
Bei einem DO-Wert von 40 % traten wegen hoher Belüftungsraten vermehrt technische Schwierigkeiten auf.

Für die Fermentation mit verschiedenen Belüftungsarten konnte gezeigt weden, daß bei Sauerstoff-Regelung mit konstantem DO gegenüber der Fermentation mit konstanter Belüftungsrate ein besseres Wachstum erzielt wird.

Bei Wachstumsversuchen im 20 l-Airlift-Fermenter und im Biostat U30D-Fermenter, ebenfalls im Airlift-Betrieb, ergaben sich Vorteile für den 20 l-Airlift-Fermenter. Die Unterschiede im Wachstum resultierten weniger aus den geometrischen Verhältnissen als vielmehr aus der Handhabung der beiden Fermenter. Für größere Airlift-Fermenter wäre eine Abstreif-Vorrichtung zur Verhinderung des Randbewuchses zu fordern.

Die Hydroxylierungs-Reaktion von MDt zu MDg durch Digitalis lanata-Zellkulturen zeigte ebenfalls eine Abhängigkeit vom Sauerstoffgehalt im Nährmedium. Die besten Resultate wurden wiederum bei einem DO von 30 % erhalten. Eine Reduzierung auf DO = 5 % hatte das Wachstum und die Hydroxylierung stark verschlechtert.
Ein Absenken des DO von 30 auf 10 % während der Fermentation verringerte die Hydroxylierungsleistung beträchtlich, ein Anheben auf die ursprünglichen 30 % verbesserte sie wieder.
Eine Steigerung des Sauerstoffgehalts auf einen DO von 50 % erbrachte keine Verbesserung der Hydroxylierung, sowohl bei Erhöhung während der Fermentation als auch bei erhöhtem Sauerstoffgehalt von Fermentationsbeginn an.

Wie schon bei den Wachstumsversuchen war auch bei einem Vergleich der Hydroxylierung bei verschiedenen Belüftungsarten die Methode der Sauerstoff-Regelung mit konstantem DO die günstigere. Auch hier zeigte sich eine Abhängigkeit der Hydroxylierung vom Sauerstoffgehalt im Nährmedium.

Bei einem Vergleich des 20 l-Fermenters mit dem Biostat U30D-Fermenter bezüglich der Hydroxylierung von MDt zu MDg erzielte der 20 l-Airlift-Fermenter einen höheren MDg-Gehalt. Bezieht man jedoch die Hydroxylierungsleistung auf die vorhandene Zellmasse, so wurde im Biostat U30D-Fermenter durch den dort vorhandenen höheren Sauerstoffgehalt deutlich mehr MDt zu MDg umgesetzt.

Verschiedene Airlift-Fermenter wurden durch Messungen des Sauerstoffübergangskoeffizienten $k_La$ verglichen. Besonders hohe Werte erreichte hierbei der 250 l-Airlift-Fermenter, der im Unterschied zu den anderen Fermentern (mit ringförmiger Luftdüse) eine Siebplatte zur Luftverteilung und andere Abmessungen besitzt.

Bei einem Vergleich der verschiedenen Rührsysteme des Biostat U30D-Fermenters durch $k_La$-Messungen zeigte sich, daß für einen besseren Sauerstoffübergang die Erhöhung der Belüftungsrate wirksamer ist als eine Steigerung der Drehzahl in dem für Pflanzenzellen möglichen Drehzahlbereich. Insgesamt waren die $k_La$-Werte der Rührer bei 100 upm mit den Werten bei Airlift-Betrieb vergleichbar.

Erfolgreich waren auch Versuche, die Hydroxylierung von MDt zu MDg bei Fermentationen mit Rührer-Betrieb durchzuführen. Sowohl bei Einsatz des Wendel-Rührers als auch des Spin-Rührers im Biostat U30D-Fermenter wurden mit über 800 mg/l höhere MDg-Gehalte als im Airlift-Fermenter erzielt. Damit konnte gezeigt werden, daß bei der Fermentation von pflanzlichen Zellkulturen nicht immer der Airlift-Fermenter vorteilhafter ist. Vielmehr muß, wie auch bei den übrigen Fermentationsbedingungen, im Einzelfall entschieden werden, welches Fermenter-System günstiger ist.

## E Literaturverzeichnis

ALFERMANN, A.W. (1983)
Gewinnung von Arzneistoffen durch pflanzliche Zellkulturen
in: Biotechnologie, Vorträge auf der 74. Hauptversammlung MNU in Tübingen, 1983; Dohmen, K. (ed.),
J.B. Metzlersche Verlagsbuchhandlung Stuttgart, pp. 47-62

ALFERMANN, A.W., BERGMANN, W., FIGUR, C., HELMBOLD, U., SCHWANTAG, D., SCHULLER, I., REINHARD, E. (1983)
Biotransformation of ß-methyldigitoxin to ß-methyldigoxin by cell cultures of Digitalis lanata
in: Plant Biotechnology; Mantell, S.H., Smith, H. (eds.), Cambridge University Press, pp. 67-74

BANDYOPADHYAY, B., HUMPHREY, A.E., TAGUCHI, H. (1967)
Dynamic Measurement of the Volumetric Oxygen Transfer Coefficient in Fermentation Systems
Biotechnology and Bioengineering 9, 533-544

BARTHLEN, U. (1983)
12ß-Hydroxylierung von ß-Methyldigitoxin in Fermenter- und Suspensionskulturen von Digitalis lanata; Untersuchungen zur Nährmediumsoptimierung
Dissertation, Tübingen

BARZ, W., ELLIS, B.E. (1981)
Potential of Plant Cell Cultures for Pharmaceutical Production
in: Natural Products as Medicinal Agents; Beal, J.L., Reinhard, E. (eds.), Hippokrates-Verlag Stuttgart, pp. 471-507

BOY, H.M. (1975)
Umwandlung von Herzglykosiden, Digitoxigenin und Digitoxigenin-Derivaten durch Zellkulturen von Digitalis lanata
Dissertation, Tübingen

CHAUBET, N. (1981)
Croissance de suspensions cellulaires de Medicago sativa sur lactose: Aspects cinétique et biochimique
Thèse, Toulouse

CLARK, T.A., CHONG, R., MADDOX, J.S. (1982)
The Effect of Dissolved Oxygen Tension on 11ß- and 19-Hydroxylation of Reichstein's Substance S by Pellicularia filamentosa
European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 14, 131-135

DECHEMA (1982)
Arbeitsmethoden für die Biotechnologie
Deutsche Gesellschaft für chemisches Apparatewesen e.V., Frankfurt

DUNN, I.J., EINSELE, A. (1975)
Oxygen Transfer Coefficients by the Dynamic Method
J. appl. Chem. Biotechnol. 25, 707-720

EINSELE, A. (1976)
Charakterisierung von Bioreaktoren durch Mischzeiten
Chemische Rundschau 29, 53-55

FIECHTER, A. (1981)
Batch and Continuous Culture of Microbial, Plant and Animal Cells
in: Biotechnology, Volume 1: Microbial Fundamentals; Rehm, H.-J., Reed, G. (eds.)
Verlag Chemie Weinheim - Deerfield Beach/Florida - Basel, pp. 453-505

FOWLER, M.W. (1981)
Plant Cell Biotechnology to Produce Desirable Substances
Chemistry and Industry, 4. April 1981, 229-233

FURUJA, T., HIROTANI, M., SHINOHARA, T. (1970)
Biotransformation of Digitoxin by Suspension Callus Cultures of Digitalis purpurea
Chem. Pharm. Bull., Tokyo, 18, 1080

GATHERCOLE, R.W.E., MANSFIELD, K.J., STREET, H.E. (1976)
Carbon Dioxide as an Essential Requirement for Cultured Sycamore Cells
Physiol. Plant. 37, 213-217

HASENBÖHLER, A. (1978)
Instrumentierung von Fermentationsanlagen
Dissertation, Tübingen

HELMBOLD, U. (1979)
Versuche zur Steigerung der 12ß-Hydroxylierung von ß-Methyldigitoxin durch Fermenterkulturen von Digitalis lanata-Zellstämmen
Dissertation, Tübingen

HENZLER, H.-J. (1980)
Begasen höherviskoser Flüssigkeiten
Chem.-Ing.-Tech. 52, 643-652

HU, Z. (1984)
Untersuchungen zur Biotransformation von Cardenoliden durch spezielle Zellstämme von Digitalis lanata
Dissertation, Tübingen

DR.W. INGOLD AG (1979)
Anleitung zu $pO_2$-Elektrode
Dr.W. Ingold AG, Urdorf (Zürich)/Schweiz

KATO, A., KAWAZOE, S., IIJIMA, M., SHIMIZU, Y. (1976)
Continuous Culture of Tobacco Cells
J. Ferment. Technol. 54, 82-87

KATO, A., SHIMIZU, Y., NAGAI, S. (1975)
Effect of Initial $k_La$ on the Growth of Tobacco Cells in Batch Culture
J. Ferment. Technol. 53, 744-751

KESSEL, R.H., CARR, A.H. (1972)
The Effect of Dissolved Oxygen Concentration on Growth and Differentiation of Carrot (Daucus carota) Tissue
J. Exp. Bot. 23, 996-1007

KING, P.J. (1980)
Cell Proliferation and Growth in Suspension Cultures
in: Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture;
Vasil, I.K. (ed.), Academic Press New York, pp. 25-53

LEE, Y.H., TSAO, G.T. (1979)
Dissolved Oxygen Elektrodes
in: Advances in Biochemical Engineering, Volume 13;
Ghose, T.K., Fiechter, A., Blakebrough, N. (eds.),
Springer-Verlag Berlin - Heidelberg - New York, pp. 35-86

MARTIN, S.M. (1980)
Environmental Factors, B. Temperature, Aeration, and pH
in: Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals;
Staba, E.J. (ed.), CRC Press Boca Raton, Florida,
pp. 143-148

MURASHIGE, T., SKOOG, F. (1962)
A Revised Medium for Rapid Growth and Bio-assays with Tobacco Tissue Cultures
Physiol. Plant. 15, 473-497

NESIUS, K.K., FLETCHER, J.S. (1973)
Carbon Dioxide and pH Requirements of Non-Photosynthetic Tissue Culture Cells
Physiol. Plant. 28, 259-263

PAREILLEUX, A., CHAUBET, N. (1981)
Mass Cultivation of Medicago sativa Growing on Lactose: Kinetic Aspects
European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 11, 222-225

PAREILLEUX, A., VINAS, R. (1983)
Influence of the Aeration Rate on the Growth Yield in Suspension Cultures of Catharanthus roseus (L.) G. Don
J. Ferment. Technol. 61, 429-433

REINHARD, E. (1974)
Biotransformation by Plant Tissue Cultures
in: Tissue Culture and Plant Science 1974; Street, H.E. (ed.), Academic Press London - New York - San Francisco, pp. 433-459

REINHARD, E. (1975)
Möglichkeiten der Verwendung von Gewebekulturen (=Zellkulturen) in der Arzneipflanzenforschung
Planta medica Suppl. 1975, 1-4

REINHARD, E., ALFERMANN, A.W. (1980)
Biotransformation by Plant Cell Cultures
in: Advances in Biochemical Engineering, Volume 16; Fiechter, A. (ed.), Springer-Verlag Berlin - Heidelberg - New York, pp. 49-83

REINHARD, E., BOY, M., KAISER, F. (1975)
Umwandlung von Digitalis-Glycosiden durch Zellsuspensionskulturen
Planta medica Suppl. 1975, 163-168

RICHARDS, J.W. (1961)
Studies in Aeration and Agitation
Progress in Industrial Microbiology 3, 141-172

ROUSSEAU, I., BU'LOCK, J.D. (1980)
Mixing Characteristics of a Simple Air-Lift
Biotechnology Letters 2, 475-480

SCHMAUDER, H.P., KOBLITZ, H. (1980)
Anwendungsmöglichkeiten von Fermentersystemen in der pflanzlichen Zell- und Gewebekultur
Abhandlungen der Akademie der Wissenschaften der DDR, N3, 205-224

SEITZ, U., ALFERMANN, A.W., REINHARD, E. (1983)
Stability of Biotransformation Capacity in Digitalis lanata Cell Cultures after Cryogenic Storage
Plant Cell Reports 2, 273-276

SINCLAIR, C.G. (1984)
Formulation of the Equations for Oxygen Transfer in Fermenters
Biotechnology Letters 6, 65-70

SMART, N.J., FOWLER, M.W. (1981)
Effect of Aeration on Large-scale Cultures of Plant Cells
Biotechnology Letters 3, 171-176

TANAKA, H. (1981)
Technological Problems in Cultivation of Plant Cells at High Density
Biotechnology and Bioengineering 23, 1203-1218

TANAKA, H. (1982)
Oxygen Transfer in Broths of Plant Cells at High Density
Biotechnology and Bioengineering 24, 425-442

TANAKA, H., NISHIJIMA, F., SUWA, M., IWAMOTO, T. (1983)
Rotating Drum Fermentor for Plant Cell Suspension Cultures
Biotechnology and Bioengineering 25, 2359-2370

TEUSCHER, E. (1973)
Probleme der Produktion sekundärer Pflanzenstoffe mit Hilfe von Zellkulturen
Pharmazie 28, 6-18

VOGELMANN, H., BISCHOP, A., PAPE, D., WAGNER, F. (1978)
Some Aspects on Mass Cultivation
In: Production of Natural Compounds by Cell Culture Methods. Alfermann, A.W., Reinhard, E. (eds.), Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung München, pp. 130-144

WAGNER, F., VOGELMANN, H. (1977)
Cultivation of Plant Tissue Cultures in Bioreactors and Formation of Secondary Metabolites
In: Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application, Barz, W., Reinhard, E., Zenk, M.H. (eds.), Springer-Verlag Berlin - Heidelberg - New York, pp. 245-252

WANK, J. (1977)
Fermentation von pflanzlichen Zellkulturen und 12ß-Hydroxylierung durch Zellkulturen von Digitalis lanata
Dissertation, Tübingen

WILSON, A. (1978)
Growth and Product Formation in Large Scale and Continuous Culture Systems
In: Frontiers of Plant Tissue Culture 1978; Thorpe, T.A. (ed.), International Association for Plant Tissue Culture, University of Calgary, Canada, pp. 169-177

ZENK, M.H. (1978)
Production von sekundären Pflanzenstoffen durch pflanzliche Zellkulturen
In: Production of Natural Compounds by Cell Culture Methods; Alfermann, A.W., Reinhard, E. (eds.), Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung München, pp. 130-152

## Lebenslauf

Am 8. November 1956 wurde ich als Sohn des Eisendrehers Franz Spieler und seiner Ehefrau Margarete, geb. Viertel, in Ravensburg geboren.

Von April 1963 bis Dezember 1966 besuchte ich die Ev. Volksschule in Ravensburg und trat anschließend in die Realschule Ravensburg ein. Im August 1969 wechselte ich in das Albert-Einstein-Gymnasium in Ravensburg, wo ich im Juni 1975 die Reifeprüfung ablegte.

Von Juli 1975 bis September 1976 leistete ich meinen Wehrdienst ab.

Im Wintersemester 1976/77 nahm ich an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen das Studium der Pharmazie auf und legte dort im September 1978 den Ersten Abschnitt, im März 1980 den Zweiten Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung ab.

Vom 1. April 1980 bis 31. März 1981 war ich in der Apotheke Vetter in Ravensburg als Pharmazie-Praktikant tätig und bestand im April 1981 den Dritten Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung.

Die Approbation als Apotheker erhielt ich am 27. Mai 1981.

Im April 1981 begann ich mit der vorliegenden Dissertation unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. E. Reinhard am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie in Tübingen. Die praktischen Arbeiten hierzu beendete ich im Juni 1984.

Bis Ende Mai 1982 war ich als wissenschaftliche Hilfskraft, danach als wissenschaftlicher Angestellter am Pharmazeutischen Institut tätig.

Am 5. Mai 1982 heiratete ich Frau Christine Spieler, geb. Frech aus Stuttgart.

Meine akademischen Lehrer waren:

H.P.T. Ammon, H. Auterhoff, E. Bayer, K. Botzenhart, E. Graf, H. Hamacher, K.-A. Kovar, E. Lindner, W. Nakel, H. Pommer, E. Reinhard, J. Schultz, H. Seiler, H.U. Seitz